



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN MORFOAGRONÓMICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE MORA DE CORPOICA Y MATERIALES DEL AGRICULTOR

NATALIA ESPINOSA BAYER

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Departamento de Agronomía, Escuela de Posgrado
Bogotá, Colombia
2011

EVALUACIÓN MORFOAGRONÓMICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE MORA DE CORPOICA Y MATERIALES DEL AGRICULTOR

NATALIA ESPINOSA BAYER

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Genética y Fitomejoramiento

Directora:

Ph.D. Luz Stella Barrero Meneses

Codirector:

Ph.D. Gustavo Adolfo Ligarreto Moreno

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía, Departamento de Agronomía, Escuela de Posgrado

Bogotá, Colombia

2011

Agradecimientos

A Dios, por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, en particular a los funcionarios de los Centros de Investigación La Selva y Tibaitatá por su apoyo decisivo tanto en las actividades de campo como de laboratorio, para el desarrollo de la presente investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía sede Bogotá, y de manera especial al cuerpo de profesores del área de Genética y Mejoramiento Vegetal, por su invaluable contribución en mi formación profesional y personal.

A la Dra. Luz Stella Barrero Meneses por su permanente apoyo en la dirección del presente trabajo.

Al Dr. Gustavo Adolfo Ligarreto Moreno, por su acompañamiento, confianza, interés y colaboración constantes durante todo el desarrollo de la maestría.

A mi familia, por su incondicional amor y apoyo en todo momento

A mis amigos Lorena Quintero, Silvia Gómez, Zulma Cárdenas, Verónica Aguirre, Keiddy Urrea, Camila Nader, Ricardo Perafán e Iván Botía, por su ánimo, consejos y colaboración en el momento justo.

Resumen

Se estudió la colección del género *Rubus* compuesta por 39 entradas de accesiones nativas y cultivadas, en su mayoría procedentes de diferentes departamentos productores de mora de Colombia con el fin de estimar su variabilidad genética, mediante tres combinaciones de marcadores AFLPs y 38 descriptores entre cuantitativos y cualitativos en la descripción morfológica. A nivel molecular y morfológico, se encontró que las agrupaciones de accesiones coinciden con la determinación taxonómica convencional para especies del género *Rubus*. Con la caracterización molecular se identificó un polimorfismo alto (>90%) en la colección explicado en mayor proporción por las especies silvestres presentes en la colección. Se conformaron tres grupos que evidenciaron que los individuos de la especie *R. nubigenus* y de la accesión RS30 fueron los más cercanos a la especie cultivada *R. glaucus*. Mientras que los individuos de las especies *R. floribundus* y *R. urticifolius* tuvieron mayor similitud entre sí. Por su parte, el grupo correspondiente a las accesiones *R. glaucus* mostró alta semejanza entre ellas, superior al 90% y no se encontró relación con el departamento de origen. Se confirma la accesión RG37 como un material intermedio tanto a nivel morfológico como molecular entre la especie *R. glaucus* y las especies silvestres. La caracterización morfológica estableció variabilidad fenotípica en los materiales *Rubus*. Además, permitió identificar agrupaciones dentro de *R. glaucus* que muestra algunas accesiones con mayor introgresión de características vegetativas de las accesiones silvestres y otras con características más adecuadas a la producción comercial, así como alguna interacción del departamento de origen en el comportamiento fenotípico de las entradas *R. glaucus*.

Palabras clave: *Rubus*, AFLPs, descriptores fenotípicos, diversidad genética

Abstract

Present work studied the genus *Rubus* collection of Colombia, it consists of 39 entries native and cultivated accessions mostly from different blackberry producers departments. In order to estimate genetic variability, it was used three combinations of AFLPs markers in molecular characterization and 38 descriptors between quantitative and qualitative in morphologic description. At molecular and morphological level, it was found that groups of accessions match with the conventional taxonomic determination species from the genus *Rubus*. With the molecular characterization it was identified a molecular a high polymorphism (> 90%), explained in a great proportion because of species wild present in the hole collection. *Rubus* entries formed three groups showing that individuals of he species *R. nubigenus* and RS30 were the closest to the species grown *R. glaucus*. While individuals of *R. floribundus* and *R. urticifolius* species had more similar to each other. Meanwhile, the group corresponding to *R. glaucus* accessions showed high similarity between them (over 90%) and there was unrelated with the department of origin. It was established RG37 accession as an intermediate material at both the morphological and molecular between species *R. glaucus* and some wild *Rubus* material. Morphological characterization recognized phenotypic variability in *Rubus* materials. In addition, it was identified clusters within *R. glaucus* showing some accessions with higher closeness of vegetative characteristics from wild accessions and others with better suited to commercial production, as well as some interaction of the department of origin in the phenotypic behavior of *R. glaucus* entries.

Keywords: *Rubus*, AFLPs, phenotypic descriptors, genetic diversity

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas.....	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Marco conceptual	5
1.1 Taxonomía del género <i>Rubus</i>	5
1.2 Origen, evolución y distribución del género <i>Rubus</i>	6
1.3 Biología reproductiva	8
1.4 Especies <i>Rubus</i> suramericanas	9
1.5 Importancia nutricional.....	10
1.6 Antecedentes de marcadores moleculares en el género <i>Rubus</i>	11
1.7 Antecedentes en Colombia.....	17
2. Materiales y métodos	20
2.1 Banco de germoplasma de <i>Rubus</i>	21
2.2 Caracterización molecular	23
2.2.1 Material vegetal.....	23
2.2.2 Extracción de ADN.....	23
2.2.3 Marcadores moleculares AFLPs	24
2.2.4 Análisis estadístico.....	25
2.3 Caracterización morfológica	28
2.3.1 Material vegetal.....	28
2.3.2 Análisis estadístico.....	28
3. Resultados	31
3.1 Caracterización molecular	31
3.1.1 Marcadores AFLPs	31
3.1.2 Análisis de agrupamiento	34
3.1.3 Análisis de diversidad genética	37
3.2 Caracterización morfológica	38
3.2.1 Análisis de componentes principales	38

X	Evaluación morfoagronómica y caracterización molecular de la colección de mora de Corpoica y materiales del agricultor	
---	--	--

3.2.2	Análisis de componentes principales	42
4.	Discusión	47
4.1	Caracterización molecular	47
4.1.1	Marcadores AFLPs	47
4.1.2	Análisis de agrupamiento	48
4.1.3	Análisis de diversidad genética	53
4.2	Caracterización morfológica	57
4.2.1	Análisis de componentes principales.....	57
4.2.2	Análisis de coordenadas principales	59
5.	Conclusiones y Recomendaciones	63
5.1.	Conclusiones	63
5.2	Recomendaciones	63
A.	Anexo: Descriptores para la caracterización de la Colección de mora <i>Rubus</i> spp.	65
B.	Anexo: Cuantificación de ADN de 39 accesiones de la colección de germoplasma ex situ de <i>Rubus</i> spp.	72
C.	Anexo: Correlaciones entre los descriptores y los cuatro primeros componentes principales.	73
	Bibliografía.....	74

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Visualización del ADN en gel de agarosa al 1% para las 39 muestras de <i>Rubus</i> extraído con kit comercial “DNeasy Plant Mini” de Qiagen.....	31
Figura 3-2: Ejemplo de polimorfismo observado en 39 accesiones de la colección nacional de <i>Rubus</i> con la combinación E-AAC/M-CTT.....	34
Figura 3-3: Dendograma construido con el índice de Dice y NTSYS pc2.0 para 39 accesiones de la colecci.....	35
Figura 3-4: Dendorgrama obtenido por análisis de componentes principales para 31 accesiones de <i>Rubus</i> spp. a partir de 31 variables cuantitativas con SPAD 5.5.	41
Figura 3-5: Dendrograma obtenido por análisis de coordenadas principales para 31 accesiones de <i>Rubus</i> spp., a partir de 26 variables cualitativas con MVSP 3.13.....	43

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Accesiones del banco de germoplasma de especies de <i>Rubus</i> estudiadas y tipo de caracterización realizada.....	22
Tabla 3-1: Porcentaje de polimorfismo de 38 combinaciones de cebadores evaluadas en cuatro accesiones de <i>R. glaucus</i>	32
Tabla 3-2: Polimorfismo de tres combinaciones de cebadores en 39 accesiones de <i>Rubus</i>	33
Tabla 3-3: Polimorfismo de tres combinaciones de cebadores en 34 accesiones de <i>R. glaucus</i>	33
Tabla 3-4: Polimorfismo de accesiones de <i>Rubus</i> spp y de accesiones de <i>R. glaucus</i> con tres combinaciones de cebadores.....	35
Tabla 3-5: Coeficientes de correlación cofenética entre diferentes índices de similitud y método de agrupación.	37
Tabla 3-6: Estimación de diversidad poblacional de la colección de <i>R. glaucus</i> vs <i>Rubus</i> silvestres y de <i>R. glaucus</i> entre cuatro departamentos.	37
Tabla 3-7: Análisis molecular de varianza de las accesiones <i>R. glaucus</i> vs <i>Rubus</i> silvestres.	38

Tabla 3-8: Análisis molecular de varianza de las accesiones colectadas en los departamentos Caldas, Antioquia, Risaralda y Cundinamarca	38
Tabla 3-9: Valores propios y porcentaje de la varianza de 31 variables cuantitativas evaluadas en <i>Rubus</i>	39
Tabla 3-10: Valores promedio de las características de las agrupaciones obtenidas por análisis de conglomerados	42
Tabla 3-11: Características de las agrupaciones obtenidas por análisis de conglomerados, con base en el análisis de coordenadas principales	44

Lista de símbolos y abreviaturas

Superíndices

Superíndice	Término
n	Exponente, potencia

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Definición
$\theta^{(I)}$	Varianza escalonada de la frecuencia alélica	$\theta^{(I)} = \frac{\sigma_{p(t)}^2}{\mu_p(1 - \mu_p)}$
$\theta^{(II)}$	θ o Fst (Weir and Cockerham, 1984)	$\theta^{(II)} = \frac{\theta^{(I)}(1 - \rho)}{(1 - \theta^{(I)}\rho)}$
Φ_{ST}	Correlación entre individuos dentro de una población en relación con el total	$\Phi_{ST} = \frac{V_{AP}}{V_{AP} + V_{WP}}$

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados, abr. del inglés Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Análisis jerárquico de varianza molecular
EST	etiqueta de secuencia expresada abr. del inglés Expressed sequence tag
gl	Grados de libertad
hs	Heterocigosidad subpoblacional
Hs	Promedio de hs de las poblaciones en estudio
Ht	Heterocigosidad panmíctica basada en el promedio de frecuencias alélicas con respecto a la población total
ID	Identificación de la accesión
km	Kilómetro

Abreviatura	Término
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar, abr. del inglés Random amplified polymorphic DNA
RF	<i>Rubus floribundus</i>
RG	<i>Rubus glaucus</i>
RNU	<i>R. nubigenus</i>
RS	<i>Rubus</i> spp.
RU	<i>Rubus urticifolius</i>
QTL	Locus de un carácter cuantitativo abr. del inglés quantitative trait locus
UPGMA	Abr. del inglés Unweighted pair group method with arithmetic mean
x	Número cromosómico de una especie

Introducción

La mora pertenece al género *Rubus*, uno de los géneros de plantas más numerosos con aproximadamente 750 especies y con mayor adaptación ambiental ya que sus especies se encuentran distribuidas en todo el mundo, excepto en la Antártica (Alice and Campbell, 1999). La importancia del género se debe a varias especies frutícolas y ornamentales de interés económico y al interés ecológico por algunas arvenses (Alice and Campbell, 1999).

Para el año 2005 se estimó que la producción mundial de especies *Rubus* fue de 154.644 toneladas, producidas en 20.035 hectáreas cultivadas a nivel comercial, más un área importante de la producción mundial de 8.000 hectáreas que aportan las especies silvestres no cultivadas, dentro de las que se cuenta *R. glaucus*. Europa fue el continente con mayor área destinada a la producción de estas especies (7.692 ha), seguido en su orden por Norteamérica, Centroamérica, Suramérica, Asia, Oceanía y África (Strik *et al.*, 2007).

El 50% de los cultivares empleados en el mundo son semierectos, 25% erectos y 25% cultivares rastreros. Los cultivares erectos y semierectos se prefieren para producir frutos de consumo en fresco, mientras que los cultivares rastreros se utilizan principalmente para fruta para procesamiento. Los cinco países que concentran las producciones más altas son en su orden Estados Unidos, China, México, Serbia y Hungría. En Centro y Suramérica la especie nativa cultivada predominante es *Rubus glaucus*, la cual se consume en los mercados internos de los países y se exporta menos del 15% (Strik *et al.*, 2007).

Las especies del género *Rubus* han acompañado la dieta humana desde la antigüedad en culturas de ambos hemisferios (Clark *et al.*, 2007). Desde el siglo IV A.C en Roma se consumían frutos frescos y bebidas de frambuesas y zarzamoras, sus hojas se utilizaban en la preparación de té con fines terapéuticos (Patel *et al.*, 2004). De igual manera, los primeros reportes de los colonizadores españoles alrededor de los años 1500, indican la

presencia de moras tanto en zonas insulares como en tierra firme del continente americano, las cuales describieron como plantas más vigorosas y en algunos casos con frutos de mayor tamaño que las especies europeas (Patiño, 2000).

En las medicinas tradicionales griegas, chinas y americanas entre otras, se han utilizado los extractos tanto de hojas como de frutos de distintas especies *Rubus*, para tratamiento de varias enfermedades e infecciones (Patel *et al.*, 2004). En los últimos años el interés en las moras y otras especies del género *Rubus* ha crecido gracias a sus altos contenidos de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides. Dado que son reconocidos en medicina por su destacada actividad antioxidante, como retardante de la oxidación de los tejidos causantes del envejecimiento físico y mental (Finn, 2008; Patel *et al.*, 2004).

Los mayores esfuerzos en mejoramiento de especies *Rubus* se han hecho en las zonas templadas, con el objetivo de desarrollar genotipos sin agujones, ramas erectas, frutos firmes, mayor tamaño de los frutos, alto rendimiento y en los últimos años en pro de buscar la fructificación de la rama primaria o principal, debido a que no produce frutos en el primer año de cultivo. Uno de los principales programas de mejoramiento genético en zarzamoras, por trayectoria y variedades obtenidas es el desarrollado por Universidad de Arkansas (Clark *et al.*, 2007).

Éste grupo evaluó la relación genética entre 32 cultivares de zarzamora norteamericanos, mediante análisis de pedigrí, dilucidando hasta sus clones originarios. Se encontró que 19 clones contribuyen en la formación de los 32 cultivares, en particular tres clones aportaron casi el 50% de los 32 cultivares, lo que evidencia una estrecha base genética (Stafne and Clark, 2004).

En Colombia, alrededor de las décadas de los setenta y ochenta el cultivo de la mora empezó a posicionarse en el país a nivel de pequeños y medianos agricultores. Pasó de ser una especie silvestre de consumo doméstico, a ser un cultivar de importancia comercial ganando rentabilidad e iniciándose su sistema de manejo agronómico. Para los años noventa y principios del siglo XXI el volumen de producción aumentó, debido a la creciente demanda como producto fresco y procesado. En consecuencia, el cultivo de mora presentó un importante aporte al producto interno bruto (PIB) agropecuario nacional, entre 0,3% y 0,44% en el período entre 1994 y 2002 (Rodríguez, 2002).

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, para el año 2008 la producción de mora en Colombia creció de 20.000 toneladas/año en 1992 a 90.000 toneladas/año en el 2008. En este mismo periodo de tiempo, aumentó el área sembrada en mora de 3.000 hectáreas a 10.500 hectáreas. Por el contrario, el rendimiento se ha mantenido alrededor de 8 ton/ha durante este intervalo de 16 años. Aunque, en los departamentos con mayor producción en los últimos cinco años (Cundinamarca, Santander y Antioquia) se han alcanzado rendimientos de hasta 15 ton/ha. En el año 2008, el cultivo de la mora tuvo una participación de 0,67% en área cultivada y 0,64% en producción nacional de cultivos permanentes, su tasa de crecimiento anual ha sido de 8,8 % en producción y 7,8% en área (Agronet, 2008).

La producción de mora en Colombia, es un sector con oportunidades de crecimiento a largo plazo por varias razones: hay disponibilidad de áreas productivas en zonas ecológicas aptas para su cultivo, tiene un alto contenido nutricional, se encuentra bien posicionada tanto a nivel de productores como de consumidores, se comercializa como fruto fresco o procesado en diferentes presentaciones (congelado y pulpa). Además ha mostrado una tendencia continua de crecimiento durante los últimos 16 años en área cultivada y en producción (Agronet, 2008; CCI, 1999).

Los limitantes de la producción comercial de mora en el país son, la dependencia de un conjunto pequeño de cultivares llamados Mora de Castilla (*R. glaucus*), los cuales han sido seleccionados por agricultores y se caracterizan por tener alta susceptibilidad a problemas fitosanitarios y bajo contenido de grados brix (Franco and Giraldo, 2001). Además, el uso de material de propagación de baja calidad que conlleva una alta incidencia de plagas y enfermedades desde los primeros estados del cultivo.

Los marcadores AFLPs (Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados) son una herramienta apropiada para obtener huellas genéticas principalmente en especies sobre las cuales no se dispone de suficiente información sobre su genoma. Éstos marcadores se destacan por producir un gran número de fragmentos, alta detección de variabilidad genética y alta reproducibilidad en los datos obtenidos. El limitante que presentan es su carácter dominante, que impide la discriminación de heterocigotos (Ferreira and Grattapaglia, 1998). Ésta técnica consiste en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción producto de la digestión total de ADN genómico, mediante la realización de tres pasos: 1. Digestión de ADN y ligación de adaptadores oligonucleótidos, 2. Amplificación selectiva de grupos de fragmentos de restricción y 3. Electroforesis de los fragmentos amplificados (Vos *et al.*, 1995).

El sistema de Bancos de Germoplasma de Colombia a cargo de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, ha consolidado una colección *ex situ* de especies *Rubus* constituida principalmente por material colectado en campos de agricultores y algunas especies silvestres, hay poco conocimiento acerca de la diversidad genética presente en las especies *Rubus* colombianas. Si bien es cierto, que se han adelantado algunos trabajos en algunas regiones del país con materiales *Rubus* tanto silvestres como cultivados (Marulanda *et al.*, 2007; Marulanda and Marquez, 2001; Morillo *et al.*, 2005; Zamorano *et al.*, 2007), se hace necesario ampliar el conocimiento de colecciones de otras regiones de las cuales se carece de información y clarificar las estrategias de conservación, las necesidades adicionales de colecta y el uso del germoplasma en programas de selección y mejoramiento genético.

Con la finalidad de conocer y promover el uso del banco de germoplasma de especies *Rubus* colombianas, así como establecer estrategias de conservación, el objeto del presente trabajo es describir la variabilidad genética presente en la colección de especies *Rubus* conservadas por Corpoica, mediante la caracterización con marcadores moleculares AFLPs y caracteres morfológicos. Para ello se plantea: 1. Identificar las combinaciones de cebadores AFLPs que evidencien el mayor polimorfismo, acompañado de alta reproducibilidad. 2. Estimar la diversidad genética dentro de los materiales conservados. 3. Caracterizar los materiales de la colección mediante descriptores morfológicos para conocer su diversidad fenotípica.

1. Marco Conceptual

1.1. Taxonomía del género *Rubus*

El género *Rubus* se caracteriza por su gran diversidad morfológica, incluye alrededor de 750 especies tanto de arbustos grandes y leñosos, como especies de plantas pequeñas herbáceas trepadoras o postradas, con láminas foliares reducidas (Alice and Campbell, 1999; Clark *et al.*, 2007). Esta amplia variación evaluada en distintos trabajos ha situado al género *Rubus* como uno de los géneros de plantas más complejos a nivel taxonómico, debido entre otros factores a la poliploidía, la apomixis, la hibridación entre especies relacionadas e incluso entre subgéneros, lo cual genera confusión sobre los límites entre una especie y otra (Alice and Campbell, 1999; Finn, 2008; Nybom and Schaal, 1990; Weber, 1996).

Focke (1910, 1914, citado por Romoleroux, 1996) fue de los primeros investigadores de la taxonomía del género *Rubus*, estableció 12 subgéneros con 429 especies, de los cuales los tres subgéneros más importantes, por el número y relevancia de las especies agrupadas, fueron: *Rubus*, *Idaeobatus* y *Malachobatus* con: 132, 117 y 115 taxones respectivamente.

En el noroeste europeo se describió el surgimiento constante de especies *Rubus* con apomixis como periódico y dinámico, se opina que éste comportamiento sea un estado normal en la evolución del género que puede ser único y cíclico entre los procesos de hibridación y estabilización de los genotipos, ya que las especies apomícticas tienen origen híbrido (Stace, 1991).

Con un análisis filogenético de ADN nuclear ribosomal con ITSs (internal transcribed spacer region) se sustentó monofilia en el subgénero *Rubus* al incluir la especie *R. glaucus*. (subg. *Idaeobatus*) y *Rubus alpinus* (subg. *Lampobatus*) y sacar a *Rubus ursinus*. Mientras que el subgénero *Idaeobatus* al presentar cuatro linajes diferentes fue polifilético (Alice, 2002; Alice and Campbell, 1999).

Los frutos agregados de las especies del género *Rubus* están conformados por un receptáculo al que se adhieren cierto número de drupeolas, cada una con una semilla en su interior. La característica de permanencia o pérdida del receptáculo en el interior del fruto durante la cosecha, se ha utilizado como una de las características útiles para distinguir los subgéneros *Rubus* e *Idaeobatus*, que corresponden a nivel hortícola en las zonas templadas a las zarzamoras o moras y a las frambuesas, respectivamente. No obstante, se encuentran varias especies de moras que comparten características con frambuesas, por lo que se cree que en la naturaleza hay flujo de genes entre éstos subgéneros en la naturaleza. En particular se observan especies con características fenotípicas compartidas entre moras y frambuesas en las especies *Rubus* de Centro y Suramérica, por tanto esta diferenciación hortícola de gran utilidad en Europa y Norteamérica, carece de aplicabilidad en especies latinoamericanas (Clark *et al.*, 2007).

La especie *R. glaucus* combina características de crecimiento y follaje (tallos y hojas) de frambuesa y características de fruto, como la permanencia del receptáculo en el fruto maduro, asociadas a las moras. Éstas características, junto con la probable reproducción apomítica y su nivel de ploidía 4x han hecho que se considerara como un posible híbrido intersubgenérico (*Rubus* x *Idaeobatus*) o anfidiplóide fértil y por otro lado han complicado su clasificación taxonómica, situándola tanto en el subgénero *Rubus* como en el subgénero *Idaeobatus* (Ballington *et al.*, 1993; Popenoe *et al.*, 1989; Popenoe, 1921; Thompson, 1997). También se ha utilizado la presencia o ausencia de diferentes tipos de antocianinas como evidencia del origen híbrido en diferentes especies y cultivares, en el caso de *R. glaucus*, se encontró el pigmento xilosa, que la asocia con la frambuesa negra (*R. occidentalis*) (Jennings and Carmichael, 1980). Los datos filogenéticos de ITSs más recientes señalan que *R. glaucus* pertenece al subgénero *Rubus* (Alice, 2002).

1.2. Origen, evolución y distribución del género *Rubus*

Las especies nativas de moras y frambuesas, se encuentran distribuidas ampliamente en Europa, Asia occidental, Norte y Centroamérica y la región Andina suramericana (Clark *et al.*, 2007). Dentro de los posibles centros de origen propuestos para el género *Rubus*, se ha considerado el suroeste chino debido a la alta proporción de especies encontradas (194 de los géneros *Idaeobatus* y *Malachobatus*, en su mayoría), número de subgéneros y variación morfológica presente. Otra teoría, propone para la familia *Rosaceae* incluyendo el género *Rubus* el antiguo continente Gondwana que agrupaba los actuales Suramérica, África, India, Australia, Madagascar, Nueva Zelanda, Nueva Guinea, Nueva Calcedonia, Tasmania y la Antártida. Un análisis filogenético con ITSs, mostró que son poco probables estas dos teorías, y propuso el oeste Norteamericano o el lejano este Asiático (Rusia, Japón) como sitios de origen del género *Rubus* de acuerdo a las especies basales de su árbol consenso (Alice and Campbell, 1999; Hernández *et al.*, 1992).

En cuanto al subgénero *Rubus*, se presume que las actuales especies de moras europeas surgieron del cruce de especies diploides primarias, sucedidos por eventos de poliploidización y seguidos de cruces entre las nuevas especies poliploides. Sin embargo la poca diversidad de especies diploides presentes en la actualidad indicaría que tales ancestros han desaparecido. En Europa las áreas con mayor diversidad de especies se han asociado con áreas que escaparon a procesos de glaciación, debido a que las temperaturas más altas incrementan la reproducción sexual de especies apomícticas, lo cual da lugar a nuevos híbridos. Debido a que las temperaturas han estado disminuyendo hasta la actualidad, las especies de moras europeas modernas han retomado su carácter apomíctico (Clark *et al.*, 2007).

En el caso de las especies de moras norteamericanas (subgénero *Rubus*), tampoco se ha observado suficiente variabilidad en las especies diploides para dar origen a las especies poliploides, particularmente en el oeste norteamericano no se han encontrado especies diploides nativas. Mientras que en el este, se ha presentado gran variabilidad en varias especies diploides las cuales pudieron haber dado lugar a las especies poliploides modernas. Las especies de moras centro y suramericanas parecen haberse derivado de pocas especies diploides primarias aún presentes y con características morfológicas distintas a las especies presentes en el resto del mundo (Clark *et al.*, 2007).

Las especies *Rubus* primarias pudieron haber llegado a Colombia hace 4,5 o 3,5 millones de años durante el Pleistoceno, una vez se consolidó la unión entre Suramérica y Centroamérica a través del Istmo de Panamá. Por tanto, aunque el ancestro cercano debe encontrarse en Norteamérica o Centroamérica, las especies *Rubus* suramericanas se diferenciaron e integraron a los ecosistemas de páramo y alta montaña andina (Hernández *et al.*, 1992).

Dentro de la evolución del género *Rubus* la poliploidía ha sido fundamental. En especies de 11 de los 12 subgéneros se encontraron niveles de ploidía entre 2x y 14x, con un número básico de 7 cromosomas (Thompson, 1997). En un estudio sobre números cromosómicos de especies del género *Rubus* spp., dentro del subgénero *Orobatus*, las seis especies estudiadas, incluyendo *Rubus macrocarpus* fueron hexaploides. Las especies diploides predominaron en el subgénero *Idaeobatus*, con pocas excepciones de especies tetraploides, y en algunas pocas se presentaron tanto individuos diploides como tetraploides (Clark *et al.*, 2007).

En el subgénero *Rubus* se ha tratado independiente a las especies según su continente de origen. Para el caso europeo, predominan las especies tetraploides con amplia variación morfológica debido a los procesos reproductivos que poseen sus especies, las cuales en su mayoría presentan apomixis facultativa e hibridan libremente incluso entre

especies poco relacionadas. Sin embargo, el principal modo reproductivo es la pseudogamia. Éste subgénero presenta en Europa un sistema de alternancia entre la reproducción sexual y la apomítica, lo que permite que haya tanto segregación como amplia dispersión de uno o pocos genotipos (Thompson, 1997).

En el subgénero *Rubus* norteamericano prevalecen las especies diploides con reproducción sexual, aunque se encuentran niveles de ploidía hasta 9x, pasando por algunas especies tetraploides que también están asociadas a apomixis facultativa como las especies europeas. De las especies suramericanas se han reportado las especies *Rubus adenothichos*, *Rubus robustus*, *Rubus urticifolius* y *Rubus bogotensis* como diploides y *R. glaucus* confirma su origen híbrido al ser reportado como tetraploide $4x = 28$. Por su parte, el subgénero *Orobatus* se distribuye de manera exclusiva en Suramérica, las especies que lo componen entre las cuales se incluye *Rubus nubigenus* o *macrocarpus*, se han reportado como hexaploides, contrario al subgénero *Rubus* suramericano en su mayoría diploide (Thompson, 1997).

1.3. Biología Reproductiva

En el género *Rubus* se presentan tres mecanismos de reproducción a saber: 1. Propagación vegetativa, hasta ahora reconocida en todas las especies. 2. Agamospermia, mecanismo presente en especies poliploides y 3. Reproducción sexual, generalizado en especies diploides (Monasterio-Huelin, 1995).

En cuanto al mecanismo de reproducción agamospérmica, se han identificado dos tipos: apomixis facultativa y pseudogamia. La primera consiste en la producción de semilla tanto por recombinación genética entre los genomas parentales, como semilla con información genética idéntica a la planta madre. Y la pseudogamia se refiere al requisito de la polinización más no de la fertilización para el inicio del desarrollo del embrión, por tanto favorece la propagación uniforme de un genotipo conservando el genoma materno. Éstos dos mecanismos reproductivos se han confirmado en algunas especies del subgénero *Rubus* de Europa, mediante RFLPs y análisis biométrico de caracteres morfológicos que indicaron la escasa variación intraespecífica y la prevalencia de pocos genotipos de amplia dispersión en la mayoría de especies poliploides apomíticas (Alice and Campbell, 1999; Antonius-Klemola, 1999; Finn, 2008; Nybom and Kraft, 1995; Weber, 1996).

La estructura poblacional de las especies del género *Rubus* se ve afectada por los modos de reproducción presentes, ésta situación ha llevado a que los individuos se definan en dos niveles organizacionales: “Genet” para identificar cada genotipo diferente, producto de la recombinación genética y originado de un cigoto. Y “Ramet” es cada uno de los individuos que conforma el genet, los cuales comparten el mismo genotipo debido a que se producen bien sea por reproducción vegetativa o apomítica, en general son indistintos fenotípicamente (Eriksson, 1993; Nybom and Schaal, 1990).

En la Mora de Castilla (*R. glaucus*) se presentan dos tipos de propagación natural, por semilla y vegetativamente. En uno de los primeros reportes sobre ésta especie, se resalta la semejanza de las plantas desde Guatemala hasta Ecuador y se sugirió la posibilidad de que sea una especie apomítica (Darrow, 1952). Un estudio preliminar sobre la biología floral de *R. glaucus*, señala en primer lugar que el número de pistilos es mayor al número de estambres por fruto en una proporción de 2:1. Y con respecto al método de polinización que permite un mejor cuajado de fruto, se encontró que la polinización cruzada muestra un número mayor de drupeolas formadas (112), que el método de autopolinización (25), así como una mejor calidad en la distribución y tamaño de las drupeolas. El estudio concluye que la mora es una especie de polinización cruzada, que permite un 20% de autopolinización y que puede presentar incompatibilidad parcial (Santana and Echeverri, 2000).

1.4. Especies *Rubus* suramericanas

En Suramérica, en los Andes ecuatorianos se han reportado pocas especies del subgénero *Idaeobatus* y en mayor proporción especies de los subgéneros *Rubus* y *Orobatus*. Una de las representantes del subgénero *Idaeobatus* es *Rubus niveus*, conocida como frambuesa, es una especie introducida proveniente de Asia continental e Indonesia que crece asilvestrada y se caracteriza por su hojas imparipinnadas (Ballington et al., 1993; Rivera et al., 1997; Romoleroux, 1996).

La especie más destacada del subgénero *Orobatus* por su valor como recurso genético y potencial para ser cultivada es *Rubus nubigenus* o *Rubus macrocarpus*, la cual es conocida a nivel internacional como “giant Colombian blackberry” y en Colombia como morón (Popenoe, 1920; Rivera et al., 1997). Se distribuye en una zona ecológica elevada entre 2600 y 3400 msnm. Se destaca por el color rojo a vino de su fruto, su sabor ligeramente ácido al madurar y el gran tamaño de sus frutos (2,5 x 5 cm), característica que dio origen a su nombre y a la atención de investigadores extranjeros para incluirla en

programas de mejoramiento (Ballington *et al.*, 1993; Popenoe *et al.*, 1989; Popenoe, 1920; Thompson, 1997).

La especie *R. glaucus*, es originaria de la zona alta tropical (2000-4000 msnm) de Centro y Suramérica, se considera como un conjunto de cultivares tradicionales de la zona y se encuentra distribuida en México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador (BIOVERSITY *et al.*, 2006; Franco and Giraldo, 2001). Es la especie cultivada del género *Rubus* de mayor importancia comercial en Colombia, Perú y Ecuador. Se desarrolla en diferentes tipos de suelo, pero crece mejor en suelos orgánicos húmedos. La corona o base del tallo y raíces son perennes, mientras que la emisión de tallos es continua durante todo el ciclo del cultivo. Las plantas tienen un crecimiento arbustivo prominente, tallos semierectos, aguijones en tallos y hojas y un distintivo color blanco en la superficie de sus tallos causado por la cerosidad que los cubre. Sus frutos son alargados, de color rojo oscuro a casi negro, jugosos y con agradable sabor ácido, lo que los hace atractivos en el exterior (Ballington *et al.*, 1993; BIOVERSITY *et al.*, 2006; Finn, 2008; Franco and Giraldo, 2001; Popenoe *et al.*, 1989).

1.5. Importancia nutricional

Dentro de los diferentes compuestos presentes en las especies *Rubus*, son especialmente importantes en la salud del ser humano los flavonoides, debido a sus propiedades antioxidantes, su acción fito-estrogénica y su amplio espectro de actividades antimicrobiales y farmacológicas. Por su parte, los polifenoles conceden las características de color y sabor al fruto y a las bebidas, mientras que a nivel farmacéutico su principal uso es como astringente. Otros compuestos han mostrado actividad vasodilatadora y tienen potencial como hipotensores. En frambuesa (*R. idaeus*) se identificaron 11 tipos de antocianinas y compuestos fenólicos (Patel *et al.*, 2004).

Al estudiar las antocianinas presentes en algunos de los 12 subgéneros establecidos por Focke (1910, 1914), se detectó diversidad en algunos de ellos como *Idaeobatus* y *Cylactis*, mientras que en los subgéneros *Rubus*, *Orobatus* y *Malachobatus* se encontró un bajo número de pigmentos (Jennings and Carmichael, 1980).

Se ha reportado que en diferentes variedades de frambuesa (*R. idaeus*), los contenidos individuales de compuestos fenólicos varían significativamente tanto por factores de desarrollo como genéticos. Lo cual sugiere que hay variabilidad para hacer selección y

mejoramiento sobre los caracteres nutricionales en *Rubus* (Anttonen and Karjalainen, 2005).

El uso de especies *Rubus* en Colombia a nivel comercial tanto a pequeña como a gran escala se ha dado en particular con la especie *R. glaucus* para su uso en preparaciones caseras y en diferentes presentaciones procesadas industrialmente. Las especies *Rubus* silvestres como *Rubus acanthophyllus*, *R. nubigenus* y *R. floribundus* entre otras, han sido usadas tradicionalmente por sus propiedades medicinales en jarabes expectorantes (Rivera *et al.*, 1997).

En cuanto a la capacidad nutricional de *R. glaucus* se hallaron altos contenidos de antocianinas y fenoles. Su contenido de antocianinas fue de 45 mg/100 g, también se encontraron dos pigmentos de cianidina en porcentajes de 40 y 45% respectivamente, altas cantidades de ácido ascórbico y alta actividad antioxidante, lo cual constituye a la Mora de Castilla como una potencial fuente natural de pigmentos, nutraceuticos y antioxidantes naturales (Garzón *et al.*, 2009).

1.6. Antecedentes de marcadores moleculares en el género *Rubus*

A nivel molecular se han adelantado varios trabajos en diferentes especies del género *Rubus* con distintos objetivos: identificación de cultivares e híbridos, estimación de las similitudes genéticas, filogenia, mapeo, determinación del sistema reproductivo y genética de poblaciones. Teniendo en cuenta, la plasticidad fenotípica del género *Rubus*, los descriptores morfológicos requieren el apoyo de técnicas moleculares en la determinación de la diversidad genética intrapoblacional (Nybom and Schaal, 1990).

En los primeros trabajos para estimar variación genética, se estudiaron 14 plantas de cuatro especies del género *Rubus* incluidas tanto frambuesas como zarzamoras (*Rubus flagellaris*, *Rubus allegheniensis*, *Rubus occidentalis* y *Rubus pensilvanicus*), mediante digestión con dos enzimas de restricción y posterior hibridación con la sonda M13. El análisis de minisatélites evidenció una alta variación intra e interespecífica, aunque algunas plantas ubicadas espacialmente cerca, mostraron igual huella genética, lo cual fue explicado por la reproducción vegetativa (apomixis o por esquejes) que se presenta en las especies estudiadas (Nybom *et al.*, 1990).

En cuanto a distribución de genotipos, teniendo en cuenta el sistema reproductivo preponderante, se evaluaron poblaciones de dos especies con hábito de crecimiento similar, *R. pensilvanicus* (zarzamora) y *R. occidentalis* (frambuesa), colectadas en un transepto de 600 m. Se realizó un análisis con minisatélites con la sonda M13, el cual permitió identificar una distribución genotípica diferencial entre poblaciones de ambas especies, dependiente del sistema reproductivo predominante en cada una. En *R. pensilvanicus* se encontró la presencia de pocos clones de amplia dispersión, mientras que en *R. occidentalis* predominó una mayor cantidad de genotipos en rangos limitados de área. Éstos resultados se atribuyeron a la prevalencia de la reproducción apomítica para el caso de *R. pensilvanicus*. Mientras que en *R. occidentalis*, se explicaron por la reproducción sexual con recombinación genética. Se concluyó que no obstante la frecuente reproducción vegetativa y apomixis presentes en el género *Rubus* hay variación genética intrapoblacional (Nybom and Schaal, 1990).

Algunas poblaciones naturales de *Rubus saxatilis* de Suecia se estudiaron durante cuatro años consecutivos para evaluar su dinámica poblacional, mediante la evaluación de las fases de su ciclo de vida e identificando genets y ramets usando marcadores RAPD. Los resultados indicaron que la dinámica de los genets para esta especie en el área de estudio (2,5 km²) corresponden al concepto fuente-vertedero, donde las poblaciones fuente representan grupos de genets con alta producción de frutos, que proveen de propágulos a las poblaciones vertedero, las cuales tienen baja densidad y están compuestas por ramets aislados con baja producción de frutos (Eriksson and Bremer, 1993).

La metodología de la sonda M13 también fue utilizada en un programa de mejoramiento de Finlandia para evaluar cruces interespecíficos entre frambuesas y zarzamoras, con el fin de distinguir los individuos obtenidos por recombinación sexual de aquellos producidos vía agamosperma. Aunque se encontró que la mayoría de progenie fueron plantas híbridas, en otros individuos la huella genética no mostró influencia paterna, lo cual evidenció apomixis en algunas plantas poco vigorosas y de baja fructificación. Al mismo tiempo, se observaron individuos con pérdida de algunas bandas maternas, lo cual sugiere que la meiosis ocurre antes del desarrollo partenogénico del óvulo (Antonius and Nybom, 1995).

Los marcadores RAPD también se validaron en un estudio preliminar para determinar relaciones entre y dentro de especies *Rubus*. Se estudiaron 24 accesiones pertenecientes a 13 especies de los géneros *Idaeobatus*, *Rubus* y *Anoplobatus*, principalmente cultivares comerciales, con 10 cebadores polimórficos tanto entre individuos cercanos así como distantes espacialmente. Se encontró concordancia de las relaciones entre especies de cada subgénero, así como con la información previa sobre el

origen del germoplasma. Solamente la especie *Rubus macraei* que está ubicada en el subgénero *Idaeobatus*, mostró una similitud baja con las otras especies del subgénero (26%), lo que indicaría la necesidad de una posible reubicación taxonómica de ésta especie (Graham and McNicol, 1995).

Cuarenta especies *Rubus* de seis subgéneros y con importancia en mejoramiento genético se evaluaron con marcadores RAPDs, con el fin de establecer la confiabilidad de las relaciones taxonómicas de manera que se pudiera suponer el éxito o fracaso en la cruzabilidad entre ellas. En general, se encontró concordancia entre el dendrograma obtenido a partir del análisis de RAPDs y la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos. Se encontraron algunas excepciones en tres especies del subgénero *Malachobatus*, las cuales se clasificaron en el subgénero *Idaeobatus* y una especie del subgénero *Idaeobatus* que se agrupó con las especies *Malachobatus*. Sin embargo, no fue posible explicar algunos comportamientos reproductivos en cruzamientos interespecíficos del mismo subgénero, ni con datos moleculares ni con datos taxonómicos (Pamfil *et al.*, 2000).

En las especies poliploides *Rubus armeniacus* y *Rubus bifrons*, se realizó un ensayo de polinización para investigar su sistema de reproducción con alozimas y marcadores AFLPs. Se encontró que la polinización, bien sea autopolinización o polinización cruzada es necesaria para iniciar la formación de la semilla. Sin embargo, la polinización cruzada incrementa ligeramente el número y calidad de las semillas formadas. De ocho alozimas evaluadas, solo una evidenció alguna variación genética dentro de las familias de semillas, el resto fueron monomórficas. Con el análisis de AFLPs se corroboró la misma tasa de variación genética (14-17 % de las plántulas fueron genéticamente diferentes al parental materno por reproducción sexual) y se encontró alta similitud dentro de familias de semillas de las dos especies *Rubus*, lo cual confirmaría su carácter apomíctico facultativo (Kollmann *et al.*, 2000).

En la especie *Rubus alceifolius*, se comparó la diversidad genética con marcadores AFLPs en poblaciones endémicas del sureste asiático con poblaciones introducidas de las islas del océano Índico y Australia, donde se ha convertido en una arvense de difícil manejo. El análisis de los datos utilizado fue el índice de similitud de Sokal y Michener o "simple matching" entre todos los individuos. En el área nativa (Tailandia, Vietnam, Laos, Java y Sumatra) *R. alceifolius* mostró gran variabilidad genética dentro de poblaciones y entre poblaciones cercanas geográficamente. Las zonas de introducción evaluadas fueron las islas La Reunion, Mayotte, Mauricio y Madagascar (océano Índico) y Queensland (Australia). En Madagascar la variabilidad genética fue un poco inferior que en la región originaria, pero aún considerable. En las islas y Queensland se propone la presencia de dos genotipos, un clon compartido en el complejo Mauricio, Mayotte y

Queensland y otro en La Reunion, ambos cercanamente relacionados con algunos individuos de Madagascar. Se indica que de la zona originaria *R. alceifolius* pudo pasar a Madagascar, de allí a las demás islas de océano Índico y posteriormente a Australia. Se resalta que el comportamiento de la especie *R. alceifolius* en las zonas de alta variación genética no es invasivo mientras que la agresividad de los clones en las demás zonas de introducción es alta, indicando que un genotipo bien adaptado a un ambiente en particular se puede propagar muy rápidamente vía reproducción asexual (Amsellem *et al.*, 2000).

De igual manera, se evaluó en *R. alceifolius* el sistema reproductivo de las poblaciones nativas y de aquellas introducidas en Madagascar y La Reunion. Debido al carácter tetraploide de la especie, se evaluaron los patrones de diversidad genética mediante AFLPs y diferencias entre hermanos medios y sus parentales maternos con marcadores microsatélite. Se encontró que las plantas del área nativa en el sur de Asia producen semillas vía reproducción sexual. Mientras que en Madagascar la reproducción sexual no explica los patrones genéticos obtenidos con microsatélites, donde más del 85% de la progenie de hermanos medios, producto de polinización abierta mostraron genotipos multilocus idénticos a sus parentales maternos y el resto de la progenie difirió en un alelo con el parental materno, lo que sugiere que en Madagascar predomina la apomixis como método de reproducción. Se plantea que al introducirse *R. alceifolius* a Madagascar, pudo hibridar con *Rubus roridus*, ambas especies del género *Malachobatus* y darse el cambio a la reproducción apomítica. En la poblaciones de La Reunion, las cuales fueron derivadas de las poblaciones de Madagascar; las plantas obtenidas por polinización controlada fueron genéticamente idénticas a los parentales maternos, por tanto la reproducción es exclusivamente apomítica (Amsellem *et al.*, 2001).

En relación con el desarrollo de variedades mejoradas de zarzamoras se han incluido especies de frambuesas, lo cual puede causar confusión en el fenotipo sobre el grupo hortícola al cual pertenece el cultivar (Clark *et al.*, 2007). Así mismo, los procesos de mejoramiento convencional que conllevan la estrechez de la base genética, dificultan la clara diferenciación de los cultivares, es por ello que los métodos moleculares se han empleado en la verificación de la identidad de genotipos cultivados. Se utilizaron ITSs (internal transcribed spacer region) de ADN nuclear ribosomal en seis cultivares *Rubus* spp., lo cual permitió distinguir entre cultivares de zarzamoras y frambuesas. Pero se mostró poca variación genética entre cultivares de zarzamoras, lo cual indica que este tipo de marcador no es el más indicado para la distinción de variedades (Stafne *et al.*, 2003).

En la especie *Rubus hochstetterorum*, la cual es endémica de las islas Azores en Portugal, se ha encontrado mayor vigor y frutos más grandes en comparación con otras especies *Rubus* introducidas, lo cual la hace interesante para programas de mejoramiento. Con el fin de investigar la diversidad de sus poblaciones espontáneas, se

desarrollaron marcadores microsatélite para esta especie y se probaron en otras especies de la familia *Rosaceae*: *R. idaeus*, *Rubus fruticosus* y Fresa (*Fragaria x ananassa*). Se identificaron 41 marcadores microsatélite en la librería genómica desarrollada. Los patrones de bandas por locus sugieren que las poblaciones evaluadas de *R. hochstetterorum* podrían ser triploides o de mayor ploidía, mientras que las otras especies tuvieron una amplificación multialélica menos frecuente (Lopes *et al.*, 2006).

En Finlandia se evaluó la diversidad genética mediante AFLPs, de seis poblaciones naturales de *Rubus arcticus* subsp. *arcticus*, que presentaban diferencias significativas en microclima y vegetación. En 122 plantas estudiadas se identificaron 78 genets. Se encontró que la variación genotípica estimada con el índice de Simpson fue relativamente alta en todas las poblaciones con un promedio de 0,26 (rango entre 0,19 y 0,32), lo cual fue explicado por la reproducción sexual presente en tales poblaciones. El análisis jerárquico de varianza molecular AMOVA indicó un 48% de variación entre poblaciones, lo cual sugiere alta diferenciación y bajo flujo de genes entre ellas (Lindqvist-Kreuze *et al.*, 2003).

En el Reino Unido, doce poblaciones silvestres de *R. idaeus* muestreadas fueron evaluadas con marcadores RAPDs con el fin de evaluar la diferenciación genética entre sí y con un cultivar comercial. Se encontró que las similitudes genéticas dentro de los sitios de muestreo fueron superiores a 80%, mientras que entre sitios las similitudes disminuyeron a un 50%, por lo cual se propuso que existía alguna barrera que impide el flujo de genes entre sitio. El análisis conjunto con datos fisiológicos estableció que las poblaciones silvestres son más diversas que el cultivar comercial y sugirió que puede haber poco flujo genético de los cultivares comerciales a las poblaciones silvestres (Graham *et al.*, 2003).

En la Universidad de Oregon, se realizó un estudio con marcadores moleculares con el fin de evaluar su utilidad en la identificación genética de accesiones *Rubus* crio-conservadas. Se desarrollaron 12 marcadores microsatélite de las librerías de los cultivares 'Meeker' y 'Marion', frambuesa y zarzamora respectivamente. Éstos marcadores se utilizaron para genotipificar 48 cultivares de frambuesa y 48 cultivares de zarzamora. Los marcadores microsatélite fueron altamente polimórficos y generaron huellas genéticas únicas en la mayoría de los cultivares de zarzamoras y frambuesas. El análisis de conglomerados neighbor joining mostró tres grupos principales correspondientes a las frambuesas, las zarzamoras y un grupo intermedio heterogéneo constituido por los materiales híbridos entre ambos grupos (Castillo, 2006).

En frambuesa roja (*R. idaeus* subsp. *idaeus*), se desarrolló un mapa de ligamiento genético de 789 cM, con marcadores AFLPs, microsatélites genómicos y ESTs (expressed sequence tag). Esta especie puede ser usada como modelo para la familia *Rosaceae*, debido a su genoma pequeño (275 Mb) y a que es diploide ($2n=2x=14$). La población de 300 individuos se originó a partir del cruce de dos cultivares fenotípicamente contrastantes, Glen Moy un cultivar europeo reciente y Latham un cultivar norteamericano más antiguo con un 60% de similitud entre ellos. Los marcadores microsatélite se desarrollaron tanto en ADN genómico como librerías ADNc de Glen Moy. Con el fin de evaluar el posible uso del mapa en análisis de QTLs, se tomaron algunos datos morfológicos en dos ambientes diferentes, como la presencia de agujones, la densidad y la dispersión de los chupones de la raíz de la planta madre. Se utilizó el programa MapQTL y se encontraron asociaciones positivas para el carácter presencia de agujones en el grupo de ligamiento dos y para densidad y dispersión de los chupones en el grupo de ligamiento ocho (Graham *et al.*, 2004).

Un mapa posterior con mayor saturación mostró una alta asociación entre el gen H y la resistencia a dos enfermedades fúngicas *Botrytis cinerea* y *Didymella applanata* en el grupo de ligamiento dos. Para la resistencia a la enfermedad de la pudrición de la raíz de frambuesa causada por *Phytophthora fragariae* var *rubi*, también se ha encontrado en poblaciones diferentes la asociación entre dos grupos de ligamiento y la resistencia genética a esta enfermedad. También se han encontrado asociaciones altas en algunos grupos de ligamiento con resistencia a virus y algunos tipos de antioxidantes (Graham and Woodhead, 2009).

Con respecto al control genético del proceso de maduración en frambuesa roja, se estudiaron en el Reino Unido los diferentes estados de maduración durante varios años y localidades, con el propósito de mapear caracteres determinantes en el desarrollo del fruto desde el estado de botón cerrado hasta el de fruto maduro e identificar marcadores asociados que puedan usarse en diferentes variedades. También, se examinaron genes reguladores que controlan la transcripción de genes estructurales en la ruta de maduración y se determinó su asociación con los QTLs identificados. Se trabajó con una familia de hermanos completos producto del cruce entre los cultivares Glen Moy y Latham, los cuales son contrastantes para varios caracteres, entre ellos la necesidad de dormancia y el desarrollo del fruto. Se encontraron regiones asociadas en el mapa de ligamiento genético con los estados de maduración del fruto, cuyos marcadores fueron significativos a través de localidades y años. Se identificaron QTLs para los estados de maduración en los cromosomas 2, 3, 5 y 6. En especial el cromosoma 3 tiene un efecto fuerte sobre la maduración, con un amplio rango de marcadores que pueden indicar la presencia de más de un QTL. Se encontraron marcadores asociados con periodos de maduración cortos y largos, así como con progenies de porte alto y bajo (Graham *et al.*, 2009a).

Una aproximación a un mapa genético en zarzamora cultivada (*Rubus*), se realizó mediante la generación de la primera librería de EST (expressed sequence tag), se diseñaron 673 marcadores basados en secuencias microsatélites y la posterior evaluación de un subgrupo de 33 marcadores microsatélite en dos cultivares de zarzamoras. Debido a que el tejido utilizado fue proveniente de hoja, la mayoría de ESTs estuvieron asociados con procesos energéticos, de estructura celular y defensa de enfermedades. La tasa de polimorfismo identificada por los 33 marcadores microsatélites fue de 30%. Al extrapolar los datos al resto de la librería, se podrían tener 940 marcadores microsatélites para detectar 1.786 polimorfismos (Lewers *et al.*, 2008).

1.7. Antecedentes en Colombia

Uno de los primeros estudios en Colombia, donde se establecieron los primeros descriptores eficientes para discriminar especies de *Rubus*, mostró que para algunos parámetros morfológicos y agronómicos existe variabilidad entre un grupo de seis materiales *Rubus* spp. Se utilizaron tres accesiones *R. glaucus* provenientes del departamento de Antioquia, uno originario de San Antonio de Prado, otro de Santa Helena (corregimientos de Medellín), y un último material originario del municipio de Guarne. Los otros tres materiales fueron *Rubus* spp. foráneos. Se identificaron con los descriptores establecidos dos claras agrupaciones entre los materiales *R. glaucus* y los foráneos. En cuanto a rendimiento dentro de los materiales nativos, el material originario de San Antonio fue el de mayor producción, lo cual se atribuyó a su precocidad, mayor cantidad de ramas productivas, inflorescencias y frutos, mejor arquitectura de la planta (bajo porte y mayor aireación) y baja o nula emisión de tallos vegetativos (Córdoba and Londoño, 1996).

En Cundinamarca, en particular en el municipio de Ubaque en la cuenca del río El Palmar, se realizó una exploración botánica y recolección de germoplasma de especies *Rubus* silvestres en un rango que comprendió entre los 1.500 y 3.600 msnm, con el fin de implementar una estrategia de conservación *ex situ*, mediante propagación *in vitro*. Además, se colectó información sobre el uso tradicional de cada una de las 10 especies encontradas. Un grupo constituido por *Rubus acanthophyllus*, *Rubus compactus*, *Rubus floribundus* y *R. macrocarpus*, se encontró restringido al Páramo (2.800-3.600 msnm). El grupo conformado por *Rubus bogotensis*, *R. glaucus*, *Rubus megalococcus* y *Rubus urticaefolius*, se caracterizó por su amplia distribución en el piso de Bosque Andino y Subandino entre los 1.500 y 3.000 msnm. Se encontró una población de *Rubus porphyromallus* restringida a 2.700 msnm. Y se reporta *R. idaeus*, como una especie de reciente introducción naturalizada. La ubicación y dispersión de las especies encontradas está relacionada con ambientes afectados por el hombre como bosques y matorrales

secundarios, cercas de piedra, linderos, bordes de carreteras y terrenos abandonados (Rivera *et al.*, 1997).

En otro trabajo, en los departamentos de Valle del Cauca, Cauca y Nariño se realizó la colecta de 36 materiales pertenecientes a tres especies *Rubus* (*R. glaucus*, *Rubus urticifolius* y *Rubus robustus*) entre los 1.600 y 3.250 msnm. Los materiales colectados fueron conservados *ex situ* en Ginebra, Valle del Cauca y caracterizados morfológicamente. Las variables cualitativas fueron analizadas con el índice de Dice y posteriormente agrupadas en un dendrograma, en tanto que las variables cuantitativas se analizaron con gráficos de dispersión y análisis de componentes principales. Con los descriptores cualitativos, se diferenciaron los materiales pertenecientes a cada una de las tres especies, principalmente con aquellos relativos a la hoja (forma, tipo, margen, ápice y color del envés). Los gráficos de dispersión permitieron identificar materiales con características comerciales importantes, como alto peso de fruto, pocas espinas en tallo y altos grados Brix. El análisis multivariado de caracteres cuantitativos de tallo y fruto determinó cinco grupos que se diferenciaron por los descriptores: distancia de entrenudos, longitud de peciolulo en rama vegetativa, longitud de pecíolo en rama reproductiva y vegetativa, ancho de foliolo, peso de fruto, longitud del corazón del fruto y número de drupeolas (Zamorano *et al.*, 2007).

A nivel molecular se realizó un estudio de diversidad genética con 44 accesiones *R. glaucus* y 15 *Rubus spp.* colectadas en los departamentos de Risaralda, Caldas y Antioquia, usando marcadores RAPD. Aunque, estos marcadores tienen limitaciones relacionadas con su naturaleza dominante y problemas de reproducibilidad, los doce cebadores utilizados mostraron 38 bandas polimórficas en un rango entre 805 y 11.505 Kb. Se calculó la similitud de acuerdo al índice de Nei y Li (Nei and Li, 1979) y el agrupamiento de los genotipos con el método UPGMA. Se encontró un 55% de similitud entre los dos grupos en estudio, mientras que entre los materiales *R. glaucus* la similitud estuvo entre 85 y 100%, además se encontró asociación con el sitio de origen de los materiales (Marulanda and Marquez, 2001).

Sobre los 36 materiales caracterizados morfológicamente por Zamorano *et al.* (2007), discriminados en 31 *R. glaucus*, tres *R. urticifolius* y dos *R. robustus* se realizó una caracterización molecular con marcadores RAMs (microsatélites aleatorios). Con los seis cebadores se presentaron 43 bandas polimórficas con pesos entre 260 y 1500 kb. El análisis de los datos se realizó con el índice de similitud de Nei y Li (1979) y el análisis de conglomerados con el método UPGMA. El análisis encontró que con un 55% de similitud se diferenciaron seis grupos relacionados con la especie a la que pertenecían las accesiones y también hubo agrupación por procedencias. A nivel intraespecífico las accesiones *R. glaucus* mostraron 0.6 de similitud (Morillo *et al.*, 2005).

En los departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda entre los 1511 y 2851 msnm se colectaron 51 muestras de especies *Rubus* cultivadas y silvestres de seis especies diferentes *R. glaucus* (27), *R. adenotrichos* (1), *R. bogotensis* (1), *R. robustus* (4), *Rubus rosifolius* (3) y *R. urticifolius* (15). Se utilizaron marcadores tipo AFLPs y microsatélite. Para el análisis de los datos obtenidos con tres combinaciones de cebadores AFLPs se utilizó el índice de similitud de Dice. Se utilizaron ocho marcadores microsatélites reportados en la especie *R. alceifolius* cuyos datos se usaron para el análisis de varianza molecular AMOVA. Los marcadores AFLPs permitieron identificar 229 bandas con pesos entre 30 y 330 pares de bases con un 91.6% de polimorfismo. El análisis estadístico indicó una alta similitud entre especies diferentes como *R. urticifolius* y *R. glaucus*, *R. glaucus* y *R. robustus* y *R. rosifolius* y *R. robustus*. La información obtenida con microsatélites evidenció tanto variabilidad interespecífica, como intraespecífica para el caso de *R. glaucus*. Para las especies *R. glaucus*, *R. urticifolius* y *R. adenotrichos* se sugieren altos niveles de ploidía. El AMOVA indica que hay mayor variación dentro que entre grupos (Marulanda *et al.*, 2007).

En la región cafetera colombiana, que comprende los departamentos de Quindío, Risaralda y Caldas se colectaron cinco materiales *R. glaucus* sin agujones, los cuales fueron evaluados por sus características agronómicas y con marcadores microsatélite junto a otros materiales del género *Rubus* incluidos *R. glaucus* con agujones. Se identificaron por componentes principales como las variables más relevantes en distinguir materiales *Rubus*: longitud y ancho de folíolos en rama vegetativa, diámetro de tallo vegetativo y número de ramas vegetativas. Mientras que aquellas relacionadas con su capacidad de producción como número de ramas reproductivas y número de yemas florales, fueron las que mostraron menor capacidad de diferenciación. En cuanto al análisis con marcadores microsatélite, se identificaron bandas polimórficas y exclusivas para algunos materiales *R. glaucus* sin agujones, indicando que hay variabilidad dentro de éste grupo (Marulanda and Lopez, 2009).

El objetivo de conformar un banco de germoplasma es conservar la variabilidad presente en las especies cultivadas y sus parientes silvestres, para promover su utilización en sistemas productivos. El Sistema de Bancos de Germoplasma de la nación colombiana, a cargo de Corpoica, posee una colección *ex situ* de especies *Rubus* en el Centro de Investigación “La Selva” en Rionegro, Antioquia, la cual incluye accesiones cultivadas y espontáneas, colectadas en diversas zonas del país, en especial de los departamentos de Antioquia, Caldas y Risaralda y algunas introducciones de otras áreas del mundo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Banco de germoplasma de *Rubus*

Se realizó la determinación taxonómica de las accesiones de la colección de especies *Rubus* evaluadas en el presente trabajo con la asesoría del curador del Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, investigador Ms.C. Juan Carlos Granados con base en la clave de especies *Rubus* compendiada en la serie Flora del Ecuador (Romoleroux, 1996) y la revisión del profesor Edgar Linares, experto en el género *Rubus*, del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Espinosa *et al.*, 2009).

Debido al ingreso frecuente de entradas a la colección, las accesiones estudiadas a nivel molecular (39 accesiones) pueden carecer de la evaluación a nivel morfológico (31 accesiones). Las accesiones incluidas en la caracterización morfológica, al momento de la toma de datos tenían una edad alrededor de tres años, las entradas más recientes solo hicieron parte del análisis molecular. Para identificar los materiales se utilizó una nomenclatura combinada de letras y números donde las letras indican la especie a la cual pertenece cada accesión así RG: *R. glaucus*, RF: *R. floribundus*, RNU: *R. nubigenus*, RU: *R. urticifolius* y RS: *Rubus spp.* (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Accesiones del banco de germoplasma de especies de *Rubus* estudiadas y tipo de caracterización realizada.

Nº	ID	Nº Acceso Corpoica	Especie	Departamento	Municipio	Altura	Estado biológico	Caracterización Molecular	Caracterización Morfológica
1	RF34	ILS 2187	<i>R. floribundus</i>	Antioquia	El Retiro	2290	Silvestre	x	
2	RF36	ILS 1817	<i>R. floribundus</i>	Antioquia	Santa Rosa	2544	Silvestre	x	x
3	RG01	ILS 2282	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Ríosucio	2200	Cultivar nativo	x	x
4	RG02	ILS 2288	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Villamaría	2200	Cultivar nativo	x	x
5	RG03	ILS 2279	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Pácora	2000	Cultivar nativo	x	x
6	RG04	ILS 2276	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Manzanares	2100	Cultivar mejorado	x	x
7	RG05	ILS 2272	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Guarne	2100	Cultivar nativo	x	x
8	RG06		<i>R. glaucus</i>	Risaralda	Santa Rosa de Cabal			x	
9	RG07	ILS 2368	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	La Ceja			x	
10	RG08	ILS 2375	<i>R. glaucus</i>	Cundinamarca	Pasca	2500	Cultivar nativo	x	
11	RG09		<i>R. glaucus</i>	Desconocido				x	x
12	RG10	ILS 2287	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Salamina	1900	Cultivar nativo	x	x
13	RG11	ILS 2273	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Guática	1800	Cultivar nativo	x	x
14	RG12	ILS 2370	<i>R. glaucus</i>	Huila				x	x
15	RG13	ILS 2269	<i>R. glaucus</i>	Quindío	Córdoba	1900	Cultivar mejorado	x	x
16	RG14	ILS 2283	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Salamina	2400	Silvestre	x	x
17	RG15		<i>R. glaucus</i>	Caldas				x	
18	RG16	ILS 2366	<i>R. glaucus</i>	Cundinamarca	Silvania		Material de agricultor	x	
19	RG17	ILS 2366	<i>R. glaucus</i>	Cundinamarca	Silvania		Material de agricultor	x	
20	RG18		<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Guarne			x	
21	RG19	ILS 2274	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	La Ceja	2300	Cultivar nativo	x	x
22	RG20	ILS 2270	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Don Matías	2430	Cultivar nativo	x	x
23	RG21	ILS 2284	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Salamina	2100	Cultivar nativo	x	x
24	RG22	ILS 2281	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Envigado	2510	Cultivar nativo	x	x
25	RG23	ILS 2286	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Salamina	2100	Cultivar mejorado	x	x
26	RG24	ILS 2280	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Manizales	2430	Silvestre	x	x
27	RG25	ILS 2285	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Salamina	2100	Cultivar nativo	x	x
28	RG26	ILS 2365	<i>R. glaucus</i>	Caldas				x	
29	RG27	ILS 2268	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Manizales	2100	Silvestre	x	x
30	RG28	ILS 2271	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	El Retiro	2500	Cultivar nativo	x	x
31	RG31	ILS 1863	<i>R. glaucus</i>	Nariño	La Cocha	2720	Material de Agricultor	x	x
32	RG32	ILS 2277	<i>R. glaucus</i>	Valle	Tulua			x	x
33	RG33	ILS 3400	<i>R. glaucus</i>	Risaralda	Santa Rosa de Cabal			x	
34	RG37		<i>R. glaucus</i>	Risaralda	Santa Rosa de Cabal			x	
35	RG38	ILS 2324	<i>R. glaucus</i>	Risaralda	Guática	2200	Material de agricultor	x	x
36	RG39		<i>R. glaucus</i>	Cundinamarca				x	

37	RG40	ILS 2278	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Jardin	2715	Silvestre		x
38	RG41	ILS 1884	<i>R. glaucus</i>	Antioquia	Medellín	2518	Cultivar Nativo		x
39	RG43	ILS 1857	<i>R. glaucus</i>	Nariño	La Cocha	2810	Material de agricultor		x
40	RG45	ILS 1861	<i>R. glaucus</i>	Nariño	La Cocha	2720	Material de Agricultor		x
41	RG47	ILS 2362	<i>R. glaucus</i>	Caldas	Manizales		Cultivar nativo		x
42	RG48	ILS 2364	<i>R. glaucus</i>	Santander	Pie de Cuesta	2150	Cultivar nativo		x
43	RNU29	ILS 2378	<i>R. nubigenus</i>	Cundinamarca	Silvania	2448	Silvestre	x	
44	RS30	ILS 2372	<i>Rubus spp.</i>	Cundinamarca	Silvania		Material de agricultor	x	
45	RU35	ILS 1865	<i>R. urticifolus</i>	Nariño	Sandoná	1839	Silvestre	x	x

ID : Identificación de la accesión usada en el presente trabajo

2.2. Caracterización Molecular

2.2.1. Material Vegetal

Se estudió un grupo de 39 accesiones de la colección de germoplasma *ex situ* de *Rubus* spp., conformada por cinco especies diferentes de la siguiente manera: 34 accesiones de *R. glaucus*, dos accesiones de *R. floribundus*, y una de cada una de las siguientes especies: *R. nubigenus* (Morón), *R. urticifolius* y *Rubus spp.* (Mora dulce) (tabla 1). Es importante aclarar que la accesión RG37 (La Macha) determinada como *R. glaucus*, muestra características morfológicas intermedias entre *R. glaucus* y posiblemente una especie silvestre no establecida.

2.2.2. Extracción de ADN

De un individuo o planta de cada accesión se utilizaron 100 mg de tejido de brotes apicales de dos a tres ramas vegetativas; el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se conservó a -70°C. Se siguió el protocolo de extracción del kit comercial “DNeasy Plant Mini” de Qiagen®, el cual utiliza columnas con una membrana a base de sílice a la cual se adhiere el ADN, el cual se almacenó a -20°C. La calidad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1 % y buffer TBE 1x y se cuantificó la cantidad de ADN con espectrofotómetro marca NanoDrop ND1000; cada muestra se llevó a una dilución final de ADN de 30 ng/μl.

2.2.3. Marcadores moleculares AFLPs

La población fue evaluada por su diversidad genética con marcadores AFLPs. Se utilizaron los kits comerciales de Invitrogen®: “AFLP core reagent kit” para digestión de ADN con las enzimas *EcoRI* y *MseI* y ligación de adaptadores; y “AFLP starter primer kit” para preamplificación y amplificación selectiva de los fragmentos de ADN digeridos y ligados. La preparación de mezclas, diluciones y condiciones de PCR en cada procedimiento de la metodología de marcadores AFLPs, correspondió con las instrucciones de los kits utilizados.

La selección de combinaciones de cebadores de AFLPs se basó en la presencia de alto polimorfismo y la reproducibilidad de los patrones de bandas. Para determinar la reproducibilidad de los AFLPs, se llevaron a cabo dos extracciones independientes de ADN a partir de brotes apicales de ramas vegetativas de una sola planta de la especie *R. glaucus*. Por cada extracción se realizaron dos digestiones-ligaciones independientes, por cada digestión-ligación se realizaron dos preamplificaciones independientes y por cada preamplificación se realizaron dos amplificaciones selectivas usando la combinación E-AAC/M-CAC, para un total de dieciséis reacciones independientes, ocho correspondientes a cada extracción.

Una vez se estableció la reproducibilidad de la metodología, se evaluaron cuatro accesiones *R. glaucus* de multiplicación vegetativa seleccionados al azar: Riosucio (RG01), Monteloro (RG32), Castilla Fusa (RG39) y Monterico Yema (RG16) utilizando un total de 38 combinaciones de cebadores con base en los reportes de diferentes especies del género *Rubus* (Amsellem *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2004; Kollmann *et al.*, 2000; Lindqvist-Kreuze *et al.*, 2003).

Para la digestión y ligación de adaptadores de acuerdo a las instrucciones y reactivos del kit, se tomaron 300 ng de ADN, a los cuales se agregaron 2 µl de enzimas de restricción (*EcoRI* / *MseI*) y 5 µl del buffer de reacción 5X y se completaron a un volumen final de 25 µl con agua destilada. Para la digestión se incubó la reacción en un termociclador MJ Research PTC 100 a 37°C por 2 horas, luego se incubó a 70°C por 15 minutos con el fin de desnaturalizar las enzimas, finalmente los tubos fueron colocados en hielo y centrifugados brevemente. Para la ligación, al ADN digerido se le adicionó una mezcla de 24 µl de solución de adaptadores y 1 µl de T4 ADN ligasa. La reacción fue incubada a 20°C ± 2°C por 2 horas en un termociclador MJ Research PTC 100. Finalizada la incubación, se realizó una dilución 1:10 de la mezcla digestión/ligación en buffer TE y se almacenó a -20°C hasta su uso. La porción no usada de la mezcla fue igualmente almacenada a -20°C.

Para la preamplificación, en un tubo para PCR de 0.2 ml se adicionaron 2.5 µl de la dilución 1:10, 20 µl de la solución “pre-amp primer mix” (que contiene los cebadores para los extremos generados por *EcoRI* cebadores para *MseI*), 2.5 µl de buffer para PCR 10X conteniendo $MgCl_2$ y 1 µl de *Taq* ADN polimerasa (5U/µl). La reacción de amplificación se llevó a cabo en termocicladores MJ Research PTC-100 durante 20 ciclos con el siguiente programa: 94°C por 30 segundos, 56°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos. El producto de amplificación fue posteriormente diluido a razón de 1:50 (3 µl del PCR mas 147 µl de buffer TE). Tanto las diluciones como la porción no usada fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Para realizar la reacción de amplificación selectiva con tres combinaciones seleccionadas (E-AAC/M-CTT, E-AAC/M-CTA, E-AGG/M-CTT) (Tabla 2), se prepararon dos soluciones de mezcla “Mix 1” y “Mix 2”. La “Mix 1” que contiene los cebadores para *EcoR* I y *Mse* I se hizo tomando 0.5 µl del cebador *EcoR* I diluido (18 µl de cebador *EcoR* I con 32 µl de agua destilada) y 4.5 µl del cebador *Mse* I. La solución “Mix 2” se preparó tomando 7.9 µl de agua destilada, 2 µl de buffer para PCR 10X conteniendo $MgCl_2$, y 0.1 µl de *Taq* ADN polimerasa. La reacción de PCR final se montó mezclando 5 µl del producto digerido y ligado diluido 1:50, 5 µl de “Mix 1” y 10 µl de “Mix 2”, para un volumen final de 20 µl. El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente: 1. Un primer ciclo: 94°C por 30 s, 65°C por 30 s, 72°C por 60 s. 2. Doce ciclos, donde la temperatura de alineamiento desciende 0.7°C en cada ciclo. Resultando una fase en cascada o “touch down” de 13 ciclos, con el fin de disminuir la amplificación de productos no específicos. 3. Finalmente 23 ciclos con: 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 60 s.

Los productos de la amplificación se separaron en geles de poliacrilamida al 6%, urea 7M con buffer TBE 1x en cámara de electroforesis vertical Biorad de 38x50 cm. Se utilizó marcador de peso molecular de 50 pares de bases de Promega® y se realizó tinción con nitrato de plata (Merril *et al.*, 1981).

2.2.4. Análisis estadístico

La matriz de datos de accesiones vs. loci se conformó a partir de la lectura de las bandas nítidas tomando presencia con el valor 1 y ausencia con valor 0. Con base en los loci evaluados en la colección *Rubus*, se calcularon los índices de similitud genética de Dice (1945) y Jaccard (1908). El primero equivalente al coeficiente de Nei y Li (1979), el cual concede mayor peso a las bandas comunes (el doble con relación a las no compartidas); por tanto, permite una mejor diferenciación de individuos con bajos niveles de similaridad entre accesiones. El coeficiente de Jaccard por su parte pondera por igual las bandas compartidas que las no compartidas (Kosman and Leonard, 2005). Para la elaboración

del dendrograma se utilizaron los algoritmos de agrupamiento jerárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) o ligamiento promedio, ligamiento simple y ligamiento completo (Sneath and Sokal, 1973). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética entre los distintos índices de similitud y cada uno de los algoritmos de agrupamiento, para establecer el algoritmo que mejor representa las relaciones de los individuos de la colección (Rohlf and Sokal, 1981). La matriz de distancias genéticas y los dendrogramas fueron calculados con el programa NTSYS pc2.0 (Rohlf, 1993).

La validación del agrupamiento se hizo por bootstrap, el cual consiste en el muestreo con reemplazo de la matriz de datos múltiples veces, construyendo sobre cada matriz un dendrograma. La frecuencia con que se forma un grupo particular entre todos los dendrogramas construidos indica el grado de soporte de ese grupo (Felsenstein, 1985). Para ello, se analizó la matriz de datos original con el programa Winboot y 2000 replicaciones (Yap and Nelson, 1996).

En el análisis poblacional, debido a que en las especies silvestres se evaluó un individuo no es posible que se asuman como poblaciones, por tanto se hicieron agrupamientos de las accesiones en estudio para su análisis estadístico. Se tomaron los 34 individuos determinados como *R. glaucus* (incluido RG37) como una población y los cinco individuos *Rubus* de especies silvestres como una segunda población. Por otra parte, se tomaron las accesiones *R. glaucus* (excluyendo RG37) correspondientes a los departamentos Caldas, Antioquia, Risaralda y Cundinamarca, cada uno como una población debido a que tuvieron la mayor representación por número de individuos de los departamentos de la colección.

Estas agrupaciones se analizaron con el programa Hickory (Holsinger and Lewis, 2003) para realizar la estimación bayesiana de $\theta^{(t)}$ bajo el modelo libre de f , un estimado del estadístico Fis, el cual indica la endogamia dentro de las poblaciones. Se utilizó este modelo debido a que el carácter dominante de los marcadores AFLPs, puede hacer poco confiable su cálculo. Por consiguiente, solo se recomienda tener en cuenta su valor si se cuenta con información previa de las poblaciones en estudio, de la cual se carece en el presente trabajo. Otra característica de éste programa es que realiza las estimaciones en ausencia del supuesto de equilibrio Hardy-Weimberg.

En Hickory, $\theta^{(t)}$ corresponde a la varianza escalonada de la frecuencia alélica, donde la varianza $\sigma_{p(t)}^2$ es medida a través del tiempo evolutivo. μ_p es la frecuencia alélica media en condiciones constantes.

$$\theta^{(I)} = \frac{\sigma_{p(t)}^2}{\mu_p (1 - \mu_p)}$$

Cuando el número de poblaciones muestreadas es pequeño, $\theta^{(II)}$ es la mejor medida de diferenciación en estudios iniciales que buscan establecer el grado de diferenciación genética entre poblaciones contemporáneas y es equivalente al estadístico θ o F_{st} (Weir and Cockerham, 1984). Para éste estadístico, ρ consiste en la correlación inferida de la muestra a la población en estudio.

$$\theta^{(II)} = \frac{\theta^{(I)}(1 - \rho)}{(1 - \theta^{(I)}\rho)}$$

También se realizó con Hickory, el cálculo de h_s como estimado de diversidad genética dentro de cada población, definido como el promedio de heterocigosidad panmíctica. h_s es el promedio de h_s de las poblaciones en estudio y H_t es la heterocigosidad panmíctica basada en el promedio de frecuencias alélicas con respecto a la población total.

Por último con el programa Genealex (Peakal and Smouse, 2006) se realizó el análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), para los casos de *R. glaucus* – *Rubus* silvestres y de los cuatro departamentos. En el análisis de la estructura poblacional a nivel genético, el AMOVA proporciona un marco general que no hace supuestos sobre frecuencias genéticas mendelianas sino que se basa en distancias euclidianas (Michalakis and Excoffier, 1996). Con Genealex también se calcula el estadístico Φ_{ST} sin estructura regional, ya que los cuatro departamentos con mayor representación por número de accesiones pueden ser agrupados como una sola región por sus características geográficas. Φ_{ST} representa la correlación entre individuos dentro de una población en relación con el total, se considera análogo a F_{st} de Weir y Cockerham (1984) cuando los datos son haploides o binarios (Michalakis and Excoffier, 1996). En la ecuación V_{AP} se refiere a la varianza entre poblaciones y V_{WP} la varianza dentro de poblaciones.

$$\Phi_{ST} = \frac{V_{AP}}{V_{AP} + V_{WP}}$$

2.3. Caracterización Morfológica

2.3.1. Material Vegetal

Se tomaron 31 accesiones de la colección de germoplasma *ex situ* de *Rubus* sembrada en Rionegro (Antioquia) con una edad de alrededor de tres años, conformada por tres especies a saber: 29 accesiones *R. glaucus*, una accesión *Rubus urticifolius* y una *Rubus floribundus* (Tabla 2-1). En cinco plantas por accesión, se midieron 22 variables cuantitativas y 16 variables cualitativas adaptadas con base en los descriptores usados para caracterizar materiales *Rubus* del sur occidente colombiano (Zamorano *et al.*, 2007) (Anexo A).

2.3.2. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos cuantitativos se realizaron análisis de componentes principales y análisis de conglomerados con el programa SPAD Versión 5.5 (Decisia, 2003). Se seleccionaron los componentes con valor propio ≥ 1 (Franco and Hidalgo, 2003). El programa SPAD utiliza el método de agrupamiento jerárquico de Ward para construir los dendrogramas, el cual busca maximizar la variación entre los grupos y minimizarla dentro de ellos (Ward, 1963).

En el caso de los datos cualitativos se utilizó el programa MVSP 3.13 (Multivariate Statistical Package) (Kovach, 1999) para realizar el análisis de coordenadas principales (PCO por sus siglas en inglés) con base en el coeficiente de similitud de Gower (Gower, 1971). La conformación de los agrupamientos se realizó con el algoritmo de agrupamiento jerárquico UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic average).

$$GGSc_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n (w_{ijk} s_{ijk})}{\sum_{k=1}^n w_{ijk}}$$

Donde: $s_{ijk} = 1 - \frac{|x_{ik} - x_{jk}|}{\text{rango}(k)}$ para datos cuantitativos

$w_{ijk} = 1$ para las coincidencias de las variables binarias o multiestado

$w_{ijk} = 0$ para todas las divergencias $w_{ijk} = 0$ para las coincidencias negativas en variables binarios

A diferencia del análisis de componentes principales que se basa en matrices de correlación o covarianza, el análisis de coordenadas principales usa varios índices de distancia o similitud. Calcula valores y vectores propios con base en distancias o similitudes calculadas directamente entre los casos en estudio, en lugar de calcularlos entre las variables como en el caso de los componentes principales, por lo tanto hace una ordenación directa de los casos. Se recomienda cuando hay mayor número de variables que casos y para evaluar de manera conjunta datos cuantitativos y cualitativos.

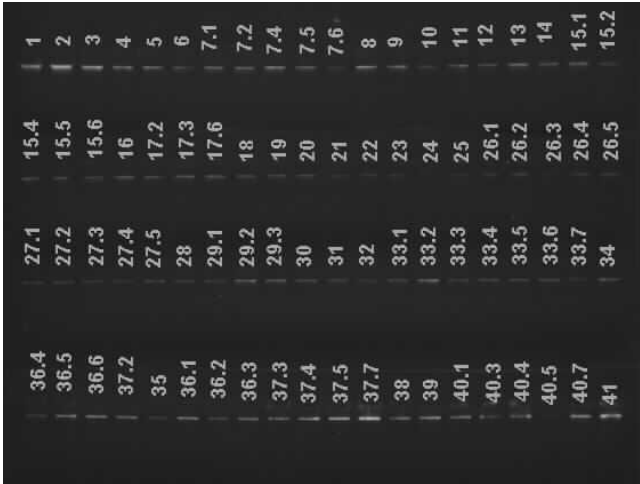
3. Resultados

3.1. Caracterización molecular

3.1.1. Marcadores AFLPs

En la prueba de reproducibilidad se encontró que el ADN extraído con kit comercial “DNeasy Plant Mini” de Qiagen® permitió obtener patrones de bandas idénticos entre las dos extracciones independientes de un mismo individuo con la combinación E-AAC/M-CAC de marcadores AFLPs. Por lo tanto, se decidió extraer ADN para las muestras del estudio utilizando el kit de Qiagen®. El ADN extraído para las muestras fue de buena calidad y se obtuvo en un rango de concentración de entre 36 y 144 ng/μl y con una relación 260/280 en un rango de 1,71 y 1,95 (Figura 3-1, Anexo B).

Figura 3-1: Visualización del ADN en gel de agarosa al 1% para las 39 muestras de *Rubus* extraído con kit comercial “DNeasy Plant Mini” de Qiagen®. Los números corresponden al número y al individuo de la accesión.



De las 38 combinaciones evaluadas en cuatro accesiones *R. glaucus* (RG01, RG32, RG39 y RG16), se descartaron 24 combinaciones debido a los siguientes resultados: 20 fueron monomórficas, dos combinaciones 100% polimórficas, una combinación con 7% de polimorfismo y una combinación con un patrón de menos de 20 bandas. De las 14 combinaciones polimórficas, siete presentaban entre 50 y 77% de polimorfismo (Tabla 3-1); de éstas 14 se seleccionaron tres combinaciones (C7: E-AAC/M-CTT, C8: E-AAC/M-CTA y C15: E-AGG/M-CTT) debido a que mostraron entre 22 y 38% de polimorfismo, con patrones reproducibles, los cuales no fueron observados en combinaciones con mayor polimorfismo.

Tabla 3-1. Porcentaje de polimorfismo de 38 combinaciones de cebadores evaluadas en cuatro accesiones *R. glaucus*.

Identificación	Combinación	% Polimorfismo	Identificación	Combinación	% Polimorfismo
C1	E-AAC/M-CTC	0	C20	E-AGC/M-CAT	0
C2	E-AAC/M-CTG	31,8	C21	E-AGC/M-CAA	39,1
C3	E-AAC/M-CAG	36,6	C22	E-AGC/M-CAC	0
C4	E-AAC/M-CAT	0	C23	E-AGC/M-CTT	0
C5	E-AAC/M-CAA	0	C24	E-AGC/M-CTA	0
C6	E-AAC/M-CAC	0	C25	E-AAG/M-CAA	0
C7*	E-AAC/M-CTT	34,2	C26	E-AAG/M-CTT	0
C8*	E-AAC/M-CTA	22,2	C27	E-ACT/M-CAT	0
C9	E-AGG/M-CTC	56,8	C28	E-ACT/M-CTG	53,2
C10	E-AGG/M-CTG	63,2	C29	E-ACG/M-CAA	0
C11	E-AGG/M-CAG	0	C30	E-ACG/M-CAC	0
C12	E-AGG/M-CAT	0	C31	E-ACA/M-CAT	0
C13	E-AGG/M-CAA	0	C32	E-ACA/M-CTG	7,7
C14	E-AGG/M-CAC	61,3	C33	E-ACT/M-CTC	37,9
C15*	E-AGG/M-CTT	37,1	C34	E-ACT/M-CAG	50
C16	E-AGG/M-CTA	0	C35	E-ACA/M-CTG	0
C17	E-AGC/M-CTC	55,6	C36	E-ACG/M-CTG	30,8
C18	E-AGC/M-CTG	0	C37	E-ACG/M-CAG	100
C19	E-AGC/M-CAG	0	C38	E-ACG/M-CTT	76,7

*Combinaciones seleccionadas para evaluar la colección de *Rubus*

En la evaluación preliminar realizada en cuatro accesiones *R. glaucus*, las combinaciones C7: E-AAC/M-CTT, C8: E-AAC/M-CTA y C15: E-AGG/M-CTT presentaron un polimorfismo entre 22% y 38% (Tabla 3-1). Los pesos de las bandas para las primeras dos combinaciones estuvieron entre 100 y 800 pb mientras que para C15 entre 50 y 650 pb. En las 39 accesiones en estudio, con las mismas combinaciones de cebadores se leyeron bandas en los mismos rangos de pares de bases. Se observaron 131 bandas totales con C7, 109 con C8 y 90 con C15. El porcentaje de polimorfismo de cada combinación al evaluar las cinco especies *Rubus*, presenta alta variación con un rango de 90,0 a 94,5% (Tabla 3-2). Al amplificar los tres cebadores seleccionados en la colección *Rubus* completa en estudio, se encontró un mayor porcentaje de polimorfismo, superior al 90% en comparación con el polimorfismo presente en las 34 accesiones *R.*

glaucus que estuvo entre 24 y 62%, debido a la presencia en la colección de accesiones de diferentes especies del género *Rubus* (Tablas 3-2 y 3-3).

Tabla 3-2. Polimorfismo de tres combinaciones de cebadores en 39 accesiones de *Rubus*.

Combinación	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas	Rango de peso molecular (pb)
E-AAC/M-CTT	131	118	90,1	100-800
E-AAC/M-CTA	109	102	93,6	100-800
E-AGG/M-CTT	90	82	91,1	50-650

Tabla 3-3. Polimorfismo de tres combinaciones de cebadores en 34 accesiones de *R. glaucus*.

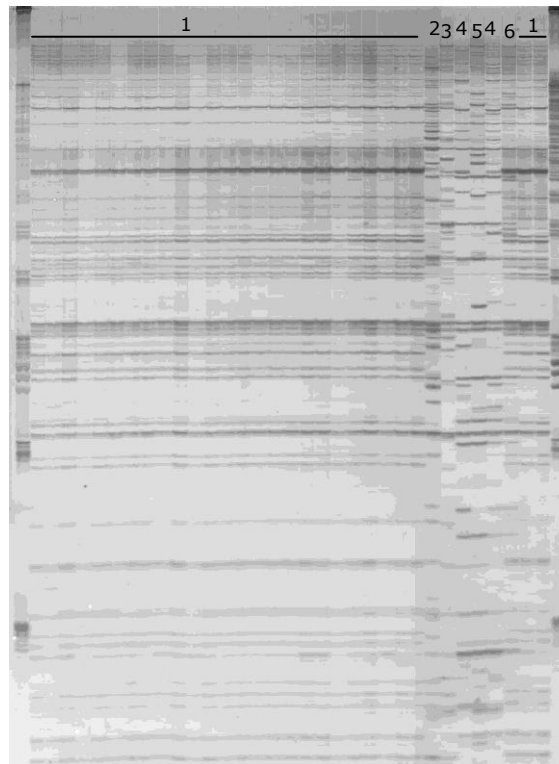
Combinación	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas	Rango de peso molecular (pb)
E-AAC/M-CTT	95	45	47,4	100-800
E-AAC/M-CTA	72	23	24,2	100-800
E-AGG/M-CTT	65	40	61,5	50-650

Dada la alta proporción de materiales de *R. glaucus* presentes en la colección, se conformó un grupo con estos materiales con el fin de establecer el polimorfismo presente para los miembros de la especie en cuestión. Se obtuvo con las tres combinaciones menor polimorfismo para las accesiones *R. glaucus* incluida RG37 que para la colección completa. Además, es evidente que las combinaciones E-AAC/M-CTT y E-AGG/M-CTT identifican mayor polimorfismo que la combinación E-AAC/M-CTA en los materiales *R. glaucus* que solo identificó un 24% de polimorfismo (Tabla 3-3). Se encontró que al incluir las cinco especies y tres combinaciones de cebadores el polimorfismo alcanza un 90,9%, mientras que en el grupo de 33 accesiones *R. glaucus* (excepto la accesión RG37) el polimorfismo se reduce de manera importante a 41,74%, lo cual indica que una fuente importante de variabilidad genética se encuentra en las especies silvestres de la colección (Tablas 3-3 y 3-4, Figura 3-2).

Tabla 3-4. Polimorfismo de accesiones de *Rubus* spp y de accesiones de *R. glaucus* con tres combinaciones de cebadores.

Grupo	Nº de individuos	Nº bandas	Nº de bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas
<i>Rubus</i> spp.	39	330	300	90,9
<i>R. glaucus</i>	33	218	91	41,7

Figura 3-2: Ejemplo de polimorfismo observado en 39 accesiones de la colección nacional de *Rubus* con la combinación E-AAC/M-CTT.



(1: Accesiones de *R. glaucus*, 2: *R. nubigenus*, 3: *Rubus* spp., 4: *R. floribundus*, 5: *R. urticifolius*, 6: La Macha (intermedio entre *R. glaucus* y especies silvestres). Marcador de 50 pb en los extremos.

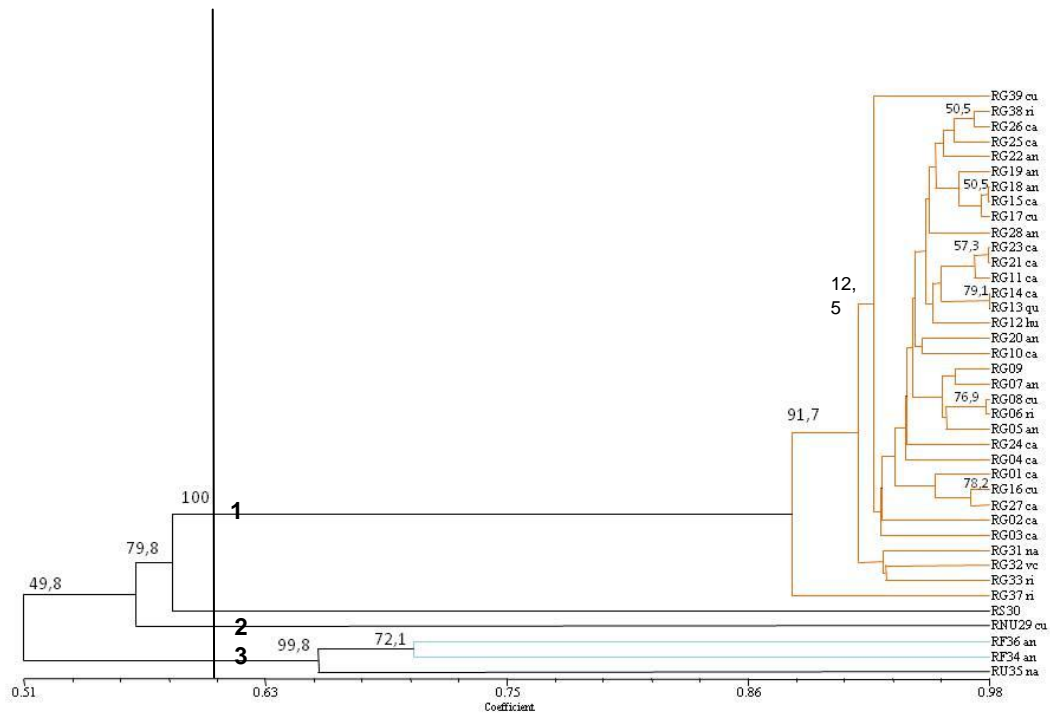
3.1.2. Análisis de agrupamiento

Del análisis de correlación cofenética entre los dos índices de similitud y los tres algoritmos de agrupamiento, se encontró que tanto el índice de Dice como el de Jaccard tienen correlaciones altas, superiores al 90% con los tres métodos de agregación. Sin embargo, el índice de Dice y el método de ligamiento promedio o UPGMA muestran la correlación más alta con 0,99691 (Tabla 3-5). Por consiguiente, se decidió presentar el análisis de agrupamiento de la colección de *Rubus* spp. con base en el índice de Dice y el método de agregación UPGMA por ser la que mejor representa las relaciones entre las accesiones *Rubus*.

Tabla 3-5. Coeficientes de correlación cofenética entre diferentes índices de similitud y método de agrupación.

Índice de similitud	Método de agregación		
	Ligamiento promedio o UPGMA	Ligamiento simple	Ligamiento completo
Dice	0.99691	0.99409	0.99424
Jaccard	0.99666	0.99504	0.99215

Figura 3-3: Dendrograma construido a partir de las relaciones de similitud con el índice de Dice y NTSYS pc2.0 para 39 accesiones de la colección colombiana de *Rubus*.



Los números en cada nodo indican los valores bootstrap significativos (>50). cu: Cundinamarca, ri: Risaralda, ca: Caldas, an: Antioquia, qu: Quindío, hu: Huila, na: Nariño, vc: Valle del Cauca. Los agrupamientos en naranja corresponden a las determinadas como *R. glaucus*, los agrupamientos en azul a *R. floribundus* y en negro las restantes especies silvestres.

El dendrograma obtenido a partir de la matriz de similitud basada en el índice de Dice, muestra que a una altura de 0,60 en la escala de similitud se establecen tres agrupaciones (Figura 3-3). La primera incluye las 34 accesiones determinadas como *R. glaucus*, la segunda comprende los dos individuos correspondientes a la especie *R. nubigenus* y la especie no determinada (RS30). El tercer grupo comprende la especie *R. floribundus*, representada por dos individuos y el individuo de la especie *R. urticifolius*.

Con una similitud de 0,57 se agrupan el conjunto de accesiones de *R. glaucus*, con la accesión RS30 y el individuo de *R. nubigenus*. La alta similitud (0,88) en el grupo de las accesiones determinadas como *R. glaucus* (RG) incluida RG37, soportado por un bootstrap superior a 90 y la falta de asociación con el sitio de origen (departamento) en las pocas ramas con soporte estadístico, indican que hay homogeneidad entre ellas; causada posiblemente por un flujo continuo de material de siembra entre los departamentos productores de mora.

En cuanto los dos individuos determinados como *R. floribundus* (RF36 y RF34), tuvieron una similitud de 0,70. Los individuos de las especies silvestres *R. floribundus* (RF36 y RF34) y *R. urticifolius* (RU35) forman un tercer grupo con una similitud de 0,65 y comparten con el conjunto de *R. glaucus*, *Rubus* spp y *R. nubigenus* alrededor de la mitad (0,51) de su patrón de bandas.

Las accesiones pertenecientes a la especie *R. glaucus* excepto RG37, muestran un grupo con una similitud mayor de 0,90 pero un valor bajo de bootstrap 12,5 (Figura 3). Las relaciones intraespecíficas de *R. glaucus* no se pueden inferir debido a que no en todos los casos, los brazos al interior de este grupo presentaron un soporte aceptable (superior a 50) en los valores de bootstrap, los cuales oscilaron entre 0,3 y 79,1. La accesión RG37 (La Macha) muestra 0,88 de similitud con el grupo de accesiones correspondientes a la especie *R. glaucus*, lo cual indica que aunque es más cercana a esta especie también comparte características moleculares con las especies silvestres del género *Rubus*. Éste individuo que fue determinado por clave taxonómica como *R. glaucus* se agrupa con los materiales pertenecientes a dicha especie, sin embargo conforma la rama más distante del grupo.

Los individuos de las especies silvestres aportan una importante fuente de diversidad genética a la colección evaluada, y deben ser tenidos en cuenta con el fin de ampliar la estrecha base genética que muestran los cultivares agrupados como Mora de Castilla (*R. glaucus*).

3.1.3. Análisis de diversidad genética

El estadístico $\theta^{(II)}$ o F_{st} como se denominará en adelante, el cual mide variación entre subpoblaciones cuando compara las accesiones *Rubus* silvestres con las entradas de *R. glaucus*, muestra una diferenciación de casi 60% entre estas dos poblaciones. Por su parte, la heterocigosidad (h_s) de la población de entradas cultivadas (0,0796) es considerablemente inferior a la población de silvestres (0,2911). De manera similar al F_{st} , el AMOVA con el valor de estadístico Φ_{ST} igual a 0,697 altamente significativo y una variación explicada del 70% entre poblaciones silvestres y cultivadas, indica una alta diferenciación genética entre el grupo de accesiones cultivadas de *R. glaucus* y el grupo de especies de *Rubus* silvestres, mientras que la variación dentro de poblaciones explicó un 30% de la variación total (Tablas 3-6 y 3-7).

Tabla 3-6. Estimación de diversidad poblacional de la colección completa de *Rubus*, de *R. glaucus* vs *Rubus* silvestres y de *R. glaucus* entre cuatro departamentos

Grupo	Nº de individuos	h_s	F_{st}	Φ_{ST}
<i>R. glaucus</i> (Con RG37)	34	0,0796±0,0043	0,5950±0,039	70%**
<i>Rubus</i> silvestres	5	0,2911±0,0117		
Caldas	14	0,2012 ±0,009	0,026 ±0,014	1% n.s
Antioquia	7	0,2020 ±0,010		
Risaralda	3	0,2056 ±0,011		
Cundinamarca	4	0,2051 ±0,010		

h_s : heterocigosidad intrapoblacional, ** altamente significativo, n.s: no significativo

Al analizar en detalle las accesiones de *R. glaucus* agrupadas por los cuatro departamentos con mayor representación por número de individuos en la colección, la diversidad genética (h_s) muestra valores cercanos entre ellos ($\approx 0,20$), la heterocigosidad promedio H_s fue de 0.2034 y la heterocigosidad panmíctica H_t 0.2076. A pesar del tamaño de muestra diferente para cada departamento, la tendencia observada es la homogeneidad genética de los materiales de *R. glaucus* al basar su estructura en el sitio de origen (Tabla 3-6), lo cual concuerda con el análisis de agrupamiento. Por su parte, el valor de F_{st} cercano a cero para los cuatro departamentos, así como el estadístico Φ_{ST} no significativo calculado en el AMOVA de 1% de variación explicada por diferencias entre departamentos, confirman que no hay evidencia estadística para considerar que existe variación genética entre las accesiones de *R. glaucus* asociada con el departamento de donde provienen (Tablas 3-6 y 3-8). Con el fin de indagar que ocurría al tomar los individuos de *R. glaucus* de los cuatro departamentos como una sola población, se encontró que el F_{st} de 28 accesiones de *R. glaucus* es superior (0,354) cuando se agrupan que al dividirlos por departamento, mientras que la H_s mantiene un valor similar al de las accesiones por departamento de 0,2088 (datos no mostrados en tabla).

Tabla 3-7. Análisis molecular de varianza de las accesiones *R. glaucus* – *Rubus* silvestres.

Fuente de Variación	gl*	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación	Estadístico	Valor	Probabilidad
Entre poblaciones	1	335,543	36,662	70%			
Dentro poblaciones	37	589,124	15,922	30%	Φ_{ST}	0,697	0,001
Total	38	924,667	52,585				

*gl: grados de libertad

Tabla 3-8. Análisis molecular de varianza de las accesiones colectadas en los departamentos Caldas, Antioquia, Risaralda y Cundinamarca.

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación	Estadístico	Valor	Probabilidad
Entre departamentos de colecta	3	30,250	0,129	1%			
Dentro de departamentos de colecta	24	223,000	9,292	99%	Φ_{ST}	0,014	0,249
Total	27	253,250	9,421				

*gl: grados de libertad

3.2. Caracterización morfológica

3.2.1. Análisis de componentes principales

Para realizar el análisis de componentes principales se incluyeron las variables de tipo reproductivo y se descartaron las accesiones en las cuales no fue posible realizar la toma de datos porque no presentaron floración y/o fructificación durante el momento de evaluación o como en el caso de la accesión RG37, la cual presentaba floración pero no cuajado de fruto bajo las condiciones del C.I. La Selva en Rionegro, Antioquia. Los resultados del análisis de componentes principales muestran que los primeros ocho componentes tienen valores propios superiores a uno y son los de mayor relevancia en la medida que agrupan alrededor de un 85% de la variación total de los datos originales (Tabla 3-9).

Tabla 3-9. Valores propios y porcentaje de la varianza de 31 variables evaluadas en *Rubus*

Componente principal	Valor propio	Varianza total explicada	
		% absoluto	% acumulado
1	9.7391	31.42	31.42
2	5.8997	19.03	50.45
3	3.1273	10.09	60.54
4	1.9245	6.21	66.74
5	1.8025	5.81	72.56
6	1.4832	4.78	77.34
7	1.2351	3.98	81.33
8	1.0707	3.45	84.78
9	0.7294	2.35	87.13
10	0.7084	2.29	89.42
11	0.5930	1.91	91.33
12	0.5670	1.83	93.16
13	0.3932	1.27	94.43
14	0.3626	1.17	95.60
15	0.3109	1.00	96.60
16	0.2537	0.82	97.42
17	0.1846	0.60	98.02
18	0.1499	0.48	98.50
19	0.1255	0.40	98.90
20	0.0934	0.30	99.21
21	0.0748	0.24	99.45
22	0.0649	0.21	99.66
23	0.0443	0.14	99.80
24	0.0274	0.09	99.89
25	0.0157	0.05	99.94
26	0.0089	0.03	99.97
27	0.0067	0.02	99.99
28	0.0026	0.01	100.00
29	0.0008	0.00	100.00
30	0.0002	0.00	100.00
31	0.0000	0.00	100.00

El primer componente principal constituye más del 30% de la varianza total explicada, de acuerdo a los datos de correlación las variables que más contribuyeron de manera positiva con éste componente fueron longitud de peciolo en rama vegetativa y reproductiva, longitud del peciolulo en rama vegetativa y longitud del foliolo en rama reproductiva, otras variables que contribuyeron en menor proporción fueron longitud del peciolulo en rama reproductiva, longitud del foliolo en rama vegetativa y tamaño de las estípulas. Por su parte las variables número de aguijones en tallo reproductivo y

vegetativo fueron las variables que más contribuyeron a este componente de forma negativa. Lo anterior indica que el primer componente agrupa accesiones con peciolo, peciolulos, foliolos y estípulas largos y menor número de aguijones en tallos (Tabla 3-10 y Anexo C).

Se observa en el Anexo C que la distinción que se realiza entre ramas vegetativas y reproductivas, para las variables de mayor correlación con los cuatro primeros componentes principales no implica mayor relevancia en la diferenciación de accesiones *Rubus* spp.; ya que las variables tomadas en los dos tipos de ramas, muestran correlaciones cercanas, como en el caso de longitud de peciolo donde la correlación es alta tanto en el caso de rama vegetativa como reproductiva.

En la Figura 3-4 se observan las agrupaciones que se obtuvieron a partir del análisis de componentes principales utilizando todas las variables morfológicas en estudio, en el cual se conformaron tres grupos de cultivares. En el grupo uno se agruparon las dos especies silvestres evaluadas (*R. urticifolius* y *R. floribundus*), lo cual muestra sus diferencias morfológicas con respecto a la especie *R. glaucus*, evidenciadas en peciolo cortos, peciolulos y foliolos intermedios, un mayor número de aguijones en la hoja (~27), mayor proporción de frutos cónicos y tallos de entrenudos largos (Tabla 3-10).

Figura 3-4: Dendrograma obtenido por análisis de componentes principales para 31 accesiones de *Rubus* spp. a partir de 31 variables cuantitativas con SPAD 5.5.

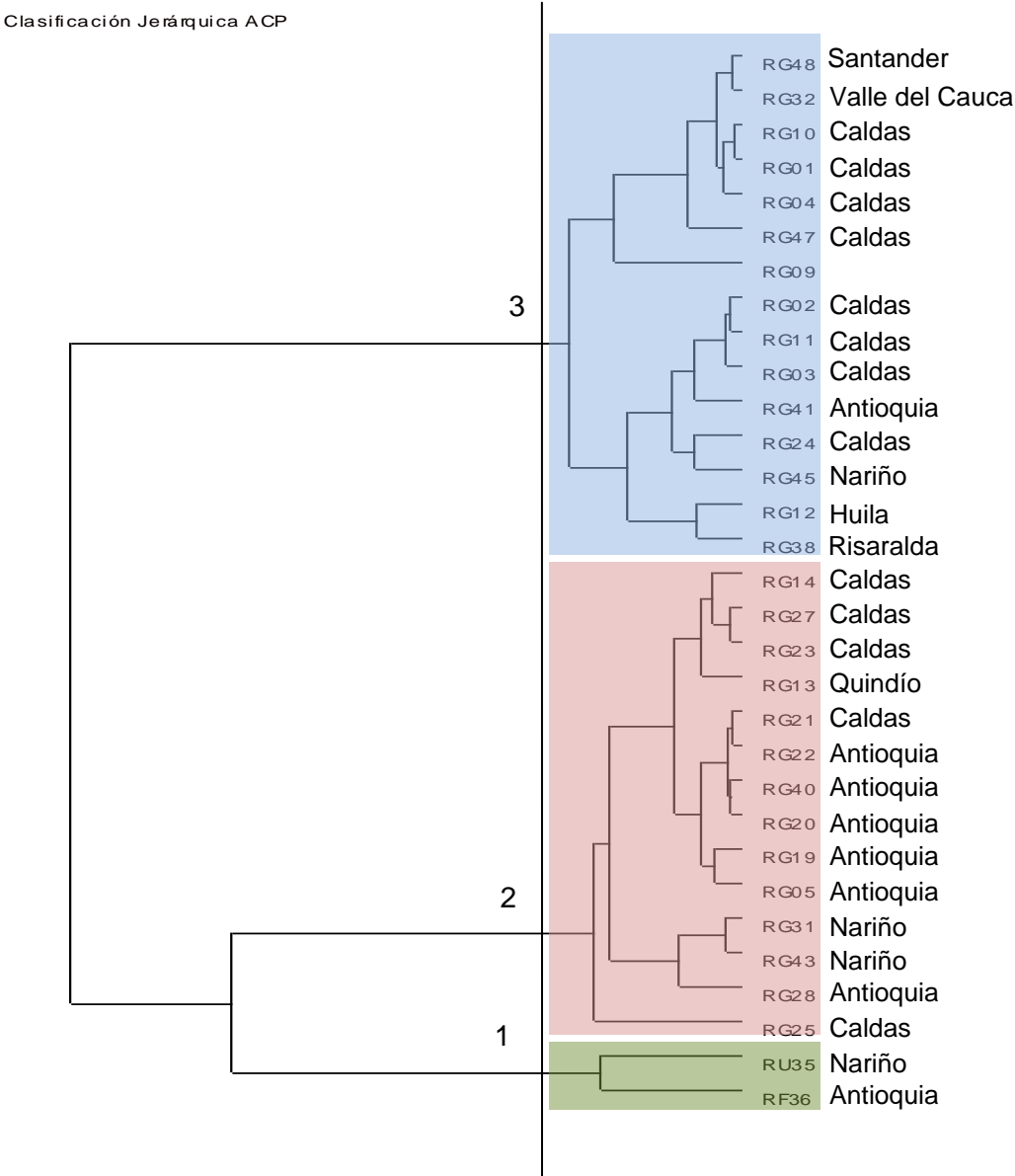


Tabla 3-10. Valores promedio de las características discriminantes en las agrupaciones obtenidas por análisis de conglomerados de caracteres cuantitativos.

Descriptores cuantitativos que más aportan a la variabilidad morfológica	Grupo 1: Especies silvestres	Grupo 2: <i>R. glaucus</i> cultivadas	Grupo 3: <i>R. glaucus</i> cultivadas
Longitud peciolo en rama vegetativa (cm)	7,38	10,08	11,19
Longitud peciolo en rama reproductiva(cm)	8,11	8,89	12,90
Longitud peciolulo en rama vegetativa (cm)	2,69	2,41	3,11
Longitud foliolo en rama reproductiva (cm)	9,81	9,46	11,17
Nº aguijones hoja en rama vegetativa	27,91	13,40	14,19
Nº aguijones hoja en rama reproductiva	26,58	13,13	14,68
Tamaño de estípulas en rama reproductiva (mm)	0,97	0,78	1,00
Número de frutos cónicos	13,33	11,57	11,96
Longitud de entrenudos en rama reproductiva (cm)	8,38	6,46	6,90
Número de piezas de la corola	5,15	5,18	5,02

Se observa que de las agrupaciones dos y tres de accesiones de *R. glaucus*, el grupo dos se compone de accesiones con características más cercanas al grupo uno de accesiones silvestres. En cambio, el grupo tres conforma el brazo más distante en el análisis de componentes principales.

Por su parte, los cultivares de la especie *R. glaucus* se dividieron en los grupos dos y tres, los cuales tuvieron en común una menor longitud de peciolo, menor número de aguijones en hoja, entre 13 y 14; tallos con entrenudos cortos y menos frutos cónicos que las especies silvestres. En el grupo dos clasificaron accesiones con peciolo (8,89-10,08 cm), peciolulos (2,41 cm) y foliolos (9,46 cm) de longitud entre corta e intermedia, mientras que en el grupo tres se asociaron materiales con peciolo (11,19-12,90 cm), peciolulos (3,11 cm) y foliolos (11,17 cm) más largos. La accesión RG38, que se distingue por la ausencia de aguijones se asocio en el grupo tres. El grupo dos reunió seis accesiones del departamento de Antioquia y cinco de Caldas, de las catorce que lo componen; mientras que en el grupo tres predominaron las accesiones colectadas en el departamento de Caldas (Figura 3-4 y Tabla 3-10).

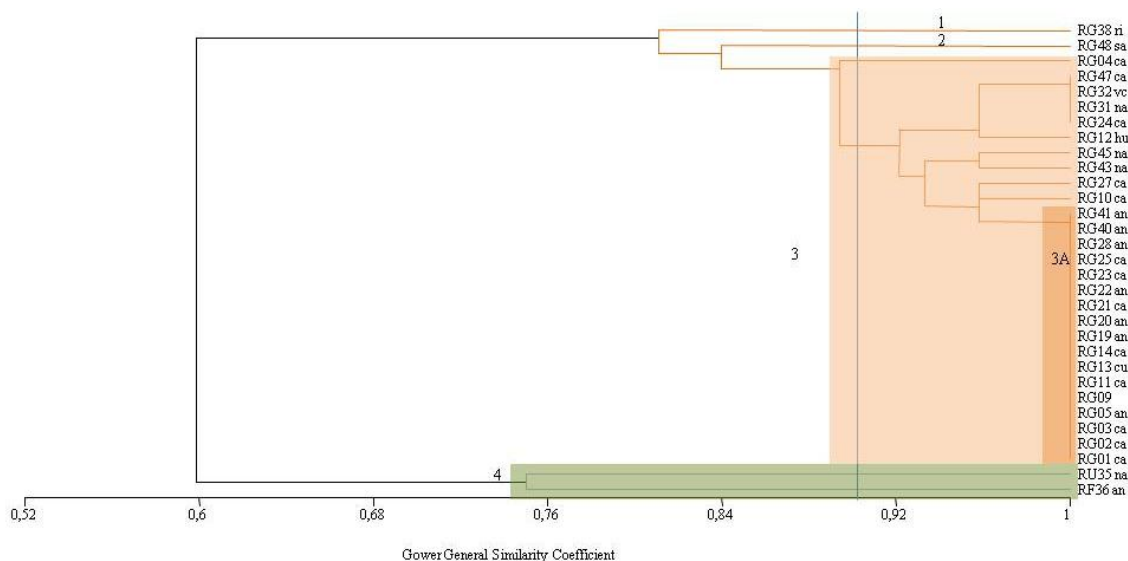
3.2.2. Análisis de coordenadas principales

En el trabajo se eliminaron los descriptores cualitativos correspondientes al estado reproductivo debido a que no pudieron ser tomados en todas las accesiones en estudio, por las razones mencionadas anteriormente. Sin embargo, se debe anotar que las

características cualitativas del estado reproductivo, son informativas y discriminantes en la caracterización de especies de *Rubus*. También se debe señalar que en las variables cualitativas la distinción entre tallo reproductivo y vegetativo es insignificante en la diferenciación de los materiales de las especies *Rubus* spp. de la colección en estudio, debido a que no indican diferencias entre los dos tipos de tallo.

Con una similitud de 0,6 encuentran concordancia las especies silvestres *R. urticifolius* y *R. floribundus* con el conjunto de accesiones de materiales cultivados *R. glaucus* debido a que comparten la característica forma de la hoja ovada-elíptica. Con una similitud de alrededor de 0,93 se establecen cuatro agrupaciones de las accesiones *Rubus* (Figura 3-5 y Tabla 3-11).

Figura 3-5: Dendrograma obtenido por análisis de coordenadas principales para 31 accesiones de *Rubus* spp., a partir de 26 variables cualitativas con MVSP 3.13



cu: Cundinamarca, ri: Risaralda, sa: Santander, ca: Caldas, an: Antioquia, qu: Quindío, hu: Huila, na: Nariño, vc: Valle del Cauca.

Las dos accesiones correspondientes a especies silvestres (*R. urticifolius* y *R. floribundus*) conforman el grupo cuatro con una similitud de 0,77 entre ellas. Las características que las diferencian de la especie *R. glaucus* son la ausencia de cera en los tallos, los tallos acanalados, la presencia de pubescencia en los tallos, los aguijones tanto rectos como recurvados en tallo y hoja, las hojas son palmeadas o combinan palmeadas y trifoliadas, el margen de la hoja es serrado, la base de la hoja es obtusa, el ápice de la hoja es agudo y el color del envés es verde (Figura 3-5 y Tabla 3-11).

Las accesiones *R. glaucus* presentan una similitud de 0,81 y sus características cualitativas comunes son: la cerosidad del tallo, el tallo redondo, la ausencia de pubescencia en el tallo, el margen de la hoja biserrado, el ápice de la hoja acuminado y el color blanco en el envés de la hoja (Figura 3-5 y Tabla 3-11).

El grupo tres se encuentra constituido por un grupo de 27 accesiones *R. glaucus*, provenientes de diferentes departamentos productores de mora. Dentro de éste grupo se encuentra una subdivisión denominada 3A, de 17 materiales en su mayoría provenientes de los departamentos de Antioquia y Caldas, idénticos (similitud igual a 1) en todas las características cualitativas entre ellos. La característica por la que difieren del resto del grupo tres es la base de la hoja subcordada en ramas vegetativas, mientras que los demás materiales del grupo la tienen subtruncada (Figura 3-5 y Tabla 3-11).

Tabla 3-11. Características de las agrupaciones obtenidas por análisis de conglomerados, con base en el análisis de coordenadas principales.

Descriptor cualitativo	Grupo 1 <i>R. glaucus</i> Sin espinas	Grupo 2 <i>R. glaucus</i> Pie de Cuesta	Grupo 3 <i>R. glaucus</i>	Grupo 3A <i>R. glaucus</i>	Grupo 4 Silvestres
Cerosidad del tallo*	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
Forma del tallo *	Redondo	Redondo	Redondo	Redondo	Acanalado
Pubescencia en el tallo *	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Forma de aguijones del tallo *	Rudimento	Recurvados	Rectos y Recurvados	Rectos y Recurvados	Rectos y Recurvados
Base del aguijón en el tallo *	Angosta	Amplia	Amplia	Amplia	Amplia
Forma de los aguijones de la hoja *	Rudimento	Recurvados	Recurvados	Recurvados	Rectos y Recurvados
Base del aguijón en la hoja *	Angosta	Amplia	Amplia	Amplia	Amplia
Forma de la hoja *	Trifoliada	Trifoliada	Trifoliada	Trifoliada	Trifoliada y palmeada
Margen de la hoja *	Biserrado	Biserrado	Biserrado	Biserrado	Serrado
Base de la hoja (V)	Subcordada	Subcordada y Subtruncada	Subtruncada	Subcordada	Obtusa
Base de la hoja (R)	Subcordada	Subtruncada	Subcordada	Subcordada	Obtusa
Ápice de la hoja *	Acuminado	Acuminado	Acuminado	Acuminado	Agudo
Forma del foliolo *	Ovado-elíptico	Ovado-elíptico	Ovado-elíptico	Ovado-elíptico	Ovado-elíptico
Color del envés *	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Verde

*En tallo vegetativo y reproductivo, V: tallo vegetativo y R: tallo reproductivo

Al grupo dos pertenece la accesión RG48 “Pie de Cuesta”, la cual se diferencia del grupo tres por presentar solo aguijones recurvados, la base de la hoja en tallo reproductivo es subtruncada en lugar de subcordada, mientras que en el tallo vegetativo la base de la hoja puede ser tanto subcordada como subtruncada. El grupo uno está compuesto por la accesión RG38 “Sin Espinas”, la cual difiere del resto de accesiones *R. glaucus* en la presencia de rudimentos de aguijones, en lugar de los aguijones característicos en especies *Rubus*, también se diferencia porque la base de estos rudimentos es angosta y no amplia como en las demás accesiones *R. glaucus* (Figura 3-5 y Tabla 3-11).

4. Discusión

4.1. Caracterización molecular

4.1.1. Marcadores AFLPs

Las combinaciones seleccionadas C7: E-AAC/M-CTT y C8: E-AAC/M-CTA fueron reportadas para la especie *Rubus alceifolius* Poir., en la cual con C7 se leyeron un total de 132 bandas, de las cuales 96 fueron polimórficas para un 72,7% de polimorfismo y en el caso de C8, 117 bandas totales, 93 polimórficas y 79,5% de polimorfismo (Amsellem *et al.*, 2000). La combinación C7 también se reportó en once genotipos silvestres y uno cultivado de *R. idaeus*, con 54 bandas polimórficas de 69 bandas totales y un polimorfismo de 76% (Ercisli *et al.*, 2008).

Aunque las tres combinaciones de marcadores muestran disminución de polimorfismo al evaluar la colección total de *Rubus* y luego las accesiones de *R. glaucus*, se observa que la combinación ocho (E-AAC/M-CTA) es en la que más reduce el polimorfismo, cuando se evalúan las accesiones de *R. glaucus*, mientras que la combinación quince (E-AGG/M-CTT) sufre una menor disminución (Tablas 3-2 y 3-3). Lo cual puede indicar que la combinación ocho sea más eficiente al evaluar diferencias entre especies de *Rubus* que entre accesiones de *R. glaucus*, y por su parte la combinación quince permita distinguir mayor polimorfismo entre materiales cultivados.

Así mismo, en la tabla 3-2 se aprecia que las mismas combinaciones al incluir las cinco especies que componen la colección de germoplasma de *Rubus*, tienen valores de bandas totales similares con los obtenidos en el reporte de Amsellem *et al.* (2000), sobre *R. alceifolius*, C7: 131 bandas en la colección *Rubus* y 132 en *R. alceifolius*; C8: 109 bandas en la colección *Rubus* y 117 en *R. alceifolius*, pero mayor número de bandas polimórficas al reportado para *R. alceifolius*: con C7, 119 bandas en la colección *Rubus* y 96 en *R. alceifolius*; con C8, 103 bandas en la colección *Rubus* y 93 en *R. alceifolius*. En el caso de genotipos de la especie diploide *R. idaeus* se identificaron 259 bandas totales con cuatro combinaciones de cebadores, de las cuales una (C7) coincide con el

presente trabajo. En el caso de ésta frambuesa se encontraron 182 bandas polimórficas y un polimorfismo de 69% entre los doce genotipos evaluados (Ercisli *et al.*, 2008). Cuando se consolidaron los datos obtenidos con las tres combinaciones de marcadores utilizadas sobre toda la colección incluidas las accesiones *R. glaucus* (tabla 3-4), se leyeron 330 bandas en total, 300 de la cuales fueron polimórficas, para un porcentaje de polimorfismo de 90,9% que evidencia el alto polimorfismo presente en las especies *Rubus* silvestres o no cultivadas frente a los individuos de la especie cultivada *R. glaucus*.

En el trabajo de caracterización con marcadores RAMs realizado por Morillo *et al.* (2005), sobre la colección de *Rubus* de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira con entradas procedentes del Valle del Cauca, Cauca y Nariño, se reporta que aunque los materiales *R. glaucus* no mostraron una variabilidad morfológica considerable, sus patrones de bandas fueron diferentes a las demás introducciones. En el presente trabajo se encuentra que las accesiones de *R. glaucus* presentan una reducción considerable en el número de bandas frente a la colección completa al pasar de 330 bandas a 218; y aunque los individuos de *R. glaucus* también muestran patrones de bandas distintos a las especies no cultivadas con la evaluación de AFLPs, entre sí exhiben alta similitud en sus patrones de bandas y a nivel morfológico se evidencian algunas variaciones como los materiales con rudimentos de agujones.

El análisis de diversidad realizado por Marulanda *et al.* (2007), en materiales de *Rubus* de cinco especies diferentes colectadas en los departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda, incluyó tres combinaciones de marcadores AFLPs diferentes a las utilizadas en el presente estudio con un polimorfismo de 91,6%. En la presente colección se tienen dos especies en común con la colección de zonas cafeteras: *R. glaucus* y *R. urticifolius* y con otras combinaciones de AFLPs se observa, que las accesiones silvestres en conjunto tuvieron una mayor proporción en el número de bandas totales y polimórficas.

4.1.2. Análisis de agrupamiento

Aunque el uso de marcadores de carácter dominante como los AFLPs no permite obtener datos de individuos heterocigotos, lo cual impide determinar con precisión o causa una subestimación de la similitud genética entre individuos, los valores de distancia pueden considerarse como una estimación aproximada pero adecuada para estudios de diversidad en el caso de organismos diploides y poliploides, a menos que los organismos tengan altos niveles de endogamia (Kosman and Leonard, 2005).

Con base en la alta correlación cofenética entre el índice de similitud de Dice y el algoritmo de agrupamiento UPGMA se obtuvo un dendrograma de la colección de *Rubus* en estudio. De acuerdo a Kosman y Leonard (2005), los patrones de bandas obtenidos con marcadores dominantes representan fenotipos en lugar de genotipos, por tanto no hacen una recomendación en particular de un índice de similitud para el caso de organismos diploides o poliploides estudiados con marcadores dominantes y sugieren no hacer inferencias genéticas con los índices estimados.

Los marcadores AFLPs permitieron observar agrupamientos evidentes por especie, en particular las especies *R. glaucus* y *R. floribundus*, que tenían más de un individuo en la colección, mostraron ramas bien sustentadas estadísticamente que no mostraron relación con el departamento de origen de las accesiones (Figura 3-3). De igual manera, el trabajo de Morillo *et al.* (2005), con marcadores RAMs discriminó las introducciones de la colección de acuerdo con su especie, pero para su colección si se observó dentro de cada especie asociación con su procedencia. En contraste, el análisis con AFLPs presentado por Marulanda *et al.* (2007), no muestra agrupaciones de accesiones de acuerdo a la especie y reporta altos índices de similitud entre individuos de diferentes especies como *R. glaucus* con *R. robustus* y *R. urticifolius*, los cuales sugiere que pueden ser híbridos interespecíficos, producto de la polinización cruzada o individuos que comparten un ancestro común.

Los dos grupos principales del dendrograma mostraron una similitud de 0,51, lo cual indica que los individuos de las especies *R. glaucus*, *R. nubigenus* y el individuo RS30, comparten alrededor de un 50% de su configuración de bandas con los individuos de las especies *R. floribundus* y *R. urticifolius*.

Aunque en la caracterización de Morillo *et al.* (2005), no se colectaron introducciones de la especie *R. floribundus*, las tres introducciones de *R. urticifolius* mostraron una similitud de 0,40 con las introducciones de *R. glaucus*. Por su parte las dos accesiones de *R. robustus* tuvieron una similitud mucho menor de 0,25 con el conglomerado *R. urticifolius* - *R. glaucus*, lo cual muestra una mayor distancia entre *R. glaucus* y *R. urticifolius* comparada con la similitud de 0,51 que en conjunto mostraron las especies *R. floribundus* y *R. urticifolius* con el agrupamiento *R. glaucus* - *R. nubigenus* - *Rubus* spp. en el presente trabajo.

En el caso de *R. floribundus* las dos accesiones presentes en la colección se consolidaron en un grupo bien soportado con una similitud cercana a 0,70. Comparada con la alta similitud entre individuos de *R. glaucus* (0,88 incluyendo la accesión RG37 y

0,91 sin ella), se puede presumir que hay mayor variabilidad al interior de la especie *R. floribundus*, pero se requiere evaluar más individuos y poblaciones de ésta especie y establecer como es su biología reproductiva y su ploidía para determinar las causas genéticas de su variabilidad. Al comparar estos resultados con el trabajo de Graham *et al.* (2003), realizado en *R. idaeus* con 12 poblaciones silvestres con un 50% de similitud entre sitios de muestreo, se evidencia una similitud mayor entre individuos de *R. floribundus* y aún más alta entre individuos *R. glaucus*.

La falta de soporte de acuerdo al análisis de bootstrap al establecer los nodos al interior de *R. glaucus*, no permite tener certeza de la relaciones entre las accesiones de *R. glaucus*, tampoco se logra hacer alguna asociación con su procedencia. Por ejemplo, las accesiones RG33 y RG38 que se distinguen fenotípicamente de las demás de *R. glaucus* por la presencia de rudimentos de aguijón en tallos y hojas, la cual es una característica altamente deseada a nivel comercial por la facilidad y mayor eficacia en las labores de campo. Aunque los dos materiales son provenientes de dos municipios distintos, ambos fueron colectados en el departamento de Risaralda. Sin embargo, en el dendrograma (Figura 3) se ubicaron en las ramas más distantes de la agrupación *R. glaucus* al no tener en cuenta la accesión RG37.

La accesión RG37 al conformar el grupo más distante dentro de *R. glaucus*, se puede considerar como un material intermedio entre la especie cultivada y las especies silvestres. Como se mencionó en materiales y métodos, posee características morfológicas compartidas entre ambos grupos, de *R. glaucus*: la presencia de cera en el tallo, tallo glabro, hojas con envés blanquecino y haz glabro y pétalos obovatos blancos; y de especies silvestres: aguijones prominentes y hojas trifoliadas y pentafoliadas (Espinosa *et al.*, 2009). Su patrón de bandas mostró esta misma condición intermedia. En la caracterización morfológica no fue posible incluir esta accesión, debido a que durante la toma de datos se observó la incapacidad del material de llegar a cuajado de fruto después de floración, por tal motivo no se puede observar su relación con las demás accesiones de acuerdo a su fenotipo.

Las entradas de *R. glaucus* en la colección en estudio, se pueden considerar individuos con una similitud alta, superior al 90% en su configuración de bandas con marcadores AFLPs, la cual puede estar asociada a la prevalencia de la propagación clonal que conlleva a la homogeneidad entre individuos indiferente del lugar de origen. Por el contrario Morillo *et al.* (2005), obtienen para su conjunto de introducciones de *R. glaucus* una similitud inferior (0,60), la cual fue explicada por las distintas procedencias geográficas de los materiales. Se debe anotar que en el trabajo de Morillo *et al.* (2005), se incluyeron 31 de accesiones *R. glaucus* todas provenientes de los departamentos del sur del país (Valle del Cauca, Cauca y Nariño), mientras que en la colección conservada

por Corpoica solo hay cuatro accesiones de 33 de *R. glaucus* procedentes de estos departamentos. Es posible que por la ubicación distante de estos departamentos con el resto de zonas productoras y el carácter rústico de su explotación, ya que no se han desarrollado cultivos comerciales como en los otros departamentos, sino que predomina la recolección de frutos en plantas espontáneas; haya habido poco flujo de material de propagación hacia el interior del país por lo cual puede haber genotipos menos domesticados, fuente de diversidad en sus poblaciones.

La alta similitud del conjunto de accesiones de *R. glaucus* (sin RG37), coincide con el reporte de Kollmann *et al.* (2000), donde familias de semillas de las especies europeas poliploides y apomícticas *R. armeniacus* y *R. bifrons*, mostraron índices de similitud de Dice entre 0,92 y 0,95 y se atribuyó entre 14 y 17% de la progenie a la reproducción sexual. Las dos especies tuvieron una similitud de 0,86 que es indicativo de su cercanía, equivalente a la que muestra RG37 con el conjunto de entradas de *R. glaucus* de 0,88.

La multiplicación clonal y la apomixis, aunque en *R. glaucus* no se ha establecido la ocurrencia de ésta última, pueden ser factores determinantes en la cercanía entre accesiones. De igual manera, la ausencia de relación con el departamento de origen puede deberse al continuo flujo de material de siembra, obtenido en su mayoría por propagación clonal, entre los principales departamentos productores de mora del país. En un trabajo de evaluación de huella genómica con AFLPs de ocho genotipos de *R. glaucus* la similitud fue de casi 95% y al igual que en el presente trabajo, hubo poco soporte de bootstrap en la conformación de las agrupaciones por accesión (Duarte, 2010). Es posible que al analizar la presente colección *Rubus*, en especial el grupo *R. glaucus* con marcadores de carácter codominante que permitan identificar heterocigosis más acertadamente, conocer más a fondo la biología reproductiva en particular determinar si ocurre o no la apomixis y realizar estudios de citogenética, se pueda establecer con mayor certeza las relaciones entre cultivares.

Aunque Santana y Echeverri (2000) reportaron a *R. glaucus* como una especie de polinización cruzada, con un porcentaje de autopolinización de 20%, es necesario verificar si en realidad la polinización conlleva la fertilización de los óvulos con la parte de genoma que aporta el polen o solo inicia el desarrollo del embrión con la información genética materna. Ya que en las especies poliploides europeas *R. armeniacus* y *R. bifrons* se comprobó su carácter apomíctico facultativo, cuando se encontró que su sistema reproductivo requiere bien sea la polinización cruzada o la autopolinización, para empezar la formación de semilla que en su mayoría (más del 80%) fue genéticamente igual al parental femenino (Kollmann *et al.*, 2000). En la evaluación sobre *R. glaucus* se encontró que la polinización natural resultó en un mejor cuajado de fruto, mayor número, calidad y distribución de las drupeolas en el fruto (Santana and Echeverri, 2000). De

igual manera Kollmann *et al.* (2000), señalaron un ligero incremento en número y calidad de semillas vía polinización abierta en *R. armeniacus* y *R. bifrons*.

Por su parte, Amsellem *et al.* (2000) obtuvieron para la mayoría de las áreas donde se introdujo la especie *R. alceifolius* altos índices de similitud de ligamiento simple (0,83-0,99) dentro de cada localidad, mientras que las zonas originarias de la especie mostraron mayor variabilidad inter e intrasitio. Este comportamiento fue asociado a la prevalencia de un solo genotipo reproducido clonalmente en las zonas de introducción. Mientras que Marulanda *et al.* (2007), señalaron que los patrones de AFLPs y de microsatélites obtenidos en su trabajo, mostraron altos índices de similitud entre especies diferentes e incluso de distinto subgénero, lo cual según su trabajo corroboraría que *R. glaucus* es un híbrido intersubgenérico entre los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus* (Thompson, 1997).

En el caso de seis poblaciones silvestres de la especie diploide y de polinización cruzada *R. arcticus* subsp. *arcticus* colectadas en Finlandia, se identificaron 78 genets entre 122 plantas. Dentro de cada población se encontraron varios genets variando en número según la población, pero entre poblaciones no se compartieron genets. Lindqvist-Kreuzer *et al.* (2003), en el análisis de conglomerados, señalan que cuatro de las seis poblaciones mostraron grupos específicos bien soportados, mientras que los genets de las otras dos poblaciones en estudio se ubicaron en varias agrupaciones, lo que se atribuyó a la polinización cruzada entre las dos poblaciones por su cercanía física. Debido a que en el presente estudio las poblaciones están constituidas por entradas colectadas en su mayoría en cultivos comerciales y se carece de la información sobre la disposición geográfica de los individuos colectados en el caso de poblaciones naturales, no es posible determinar la constitución organizacional de individuos en genets y ramets, como es usual para especies de multiplicación sexual y clonal simultánea (Eriksson, 1993).

Dado que en la especie cultivada *R. glaucus* se presenta la propagación clonal de forma natural y aunque como se mencionó anteriormente, su biología reproductiva favorece la polinización cruzada natural; el proceso de domesticación ha concedido mayor relevancia a la multiplicación de clones en cultivos comerciales. Por tanto, en caso de reproducción sexual en un campo cultivado habría recombinación entre individuos clonales, que podrían presentar algún porcentaje de apomixis como se ha reportado en la mayoría de especies *Rubus* poliploides (Alice and Campbell, 1999; Antonius-Klemola, 1999; Finn, 2008; Nybom and Kraft, 1995). Lo cual favorecería la continuación en la descendencia del genotipo materno. En el caso de darse alguna recombinación genética por polinización cruzada sería entre clones con genotipos muy similares, lo cual en algunos casos daría alguna variabilidad al interior de los cultivares de *R. glaucus* y en otros casos

como indican Ellstrand y Rose (1987) se podría producir descendencia idéntica a los padres. De ésta manera también se podría explicar la alta similitud (0,91) entre las accesiones de *R. glaucus* de la colección.

4.1.3. Análisis de diversidad genética

Debido a que los AFLPs se consideran marcadores de herencia dominante, las formulas estándar para el cálculo de diversidad inter e intrapoblacional han sido objeto de debate, lo cual ha llevado al desarrollo de estadísticos análogos que permitan obtener estimaciones adecuadas en genética de poblaciones para marcadores dominantes (Nybom, 2004; Zhivotovsky, 1999).

Entre las accesiones *R. glaucus* y las *Rubus* silvestres el F_{st} alcanza un valor de 0,595 que indica una alta diferenciación genética entre las entradas cultivadas y las silvestres en la colección en estudio, explicada en un 60% por diferencias genéticas entre ellas. En la colección de especies *Rubus* se explica un valor F_{st} alto, debido a la heterocigosidad de las especies silvestres muy superior a la heterocigosidad de las entradas cultivadas. Éste resultado muestra una diferencia en la misma tendencia que la indicada con el índice de similitud de Dice en donde los dos grupos más distantes del dendrograma muestran una similitud de 0,51.

La diversidad genética representada en h_s , al comparar el grupo de entradas cultivadas y el grupo de entradas silvestres, indica una evidente superioridad en diversidad en el grupo silvestre (0,2911) frente a la población cultivada (0,0796), aún cuando en las cultivadas se dejó RG37 con su genotipo intermedio entre *R. glaucus* y alguna silvestre. De manera similar el AMOVA indicó un 70% de variación explicada por las diferencias genéticas entre el grupo de especies silvestres y el grupo de *Rubus* cultivadas y un 30% se atribuyó a variación dentro de poblaciones, lo que indica una alta diversidad genética en la colección de especies *Rubus* conservada, representada en particular en sus especies silvestres.

La variación dentro de poblaciones en este caso la heterocigosidad, al calcularse con marcadores de tipo dominante ha mostrado ser inferior en comparación con la obtenida con marcadores codominantes (Nybom, 2004). Entre algunas causas se han citado menor proporción de polimorfismos, la presencia alta de alelos nulos, el apareamiento entre individuos similares o la autopolinización parcial (Krauss, 2000; Nybom, 2004). Por ello y también por diferencias en el origen de los materiales, en el trabajo realizado por

Marulanda *et al.* (2007) con los datos derivados de marcadores microsatélite la heterocigosidad media total H_t en 27 accesiones *R. glaucus* fue de 0,2786, mientras que para las 28 accesiones originarias de cuatro departamentos productores evaluadas en el presente trabajo se encontró que H_t fue ligeramente menor con 0,2076.

En el caso de la diversidad genética dentro de cada departamento, la heterocigosidad de cada departamento muestra valores similares a 0,20, así mismo la heterocigosidad promedio entre subpoblaciones (H_s) fue 0,2034, la heterocigosidad total (H_t) de 0,2076 y la H_s al unificar los departamentos como una sola población fue muy cercana (0,2088). Lo cual muestra baja diversidad genética entre los materiales de *R. glaucus* colectados en cada uno de los cuatro departamentos. Los valores de heterocigosidad subpoblacional H_s para *R. glaucus* dividida o no por departamento, fueron muy similares al que reportó Nybom (2004) para especies perennes de ciclo corto (0,20) con marcadores dominantes. En éste estimador no es afectado por el número de individuos muestreados.

En el grupo de cuatro departamentos, el estadístico $F_{st} = 0,026$ al ser tan cercano a cero, indica que las accesiones entre los cuatro departamentos con mayor representación de individuos *R. glaucus* son similares y no hay estructura poblacional entre los materiales al tenerse en cuenta el departamento de origen de ellos. En confirmación de lo anterior, el estadístico Φ_{ST} análogo también al F_{st} de Weir y Cockerham (1984), también mostró un valor cercano a cero de 0,014 y un 1% no significativo de la variación fue explicado por diferencias entre departamentos, es decir que los individuos serían genéticamente similares. Éste dato tiene una alta confiabilidad ya que se ha reportado que al comparar entre diferentes tipos de marcadores RAPDs, AFLPs y SSRs, la variación entre poblaciones en particular el estadístico Φ_{ST} no es afectado por el tipo de marcador, número de poblaciones, ni por el número de plantas muestreadas (Nybom, 2004). El estadístico Φ_{ST} en el presente trabajo muestra un valor muy inferior (0,014) al reportado de 0,41 para especies perennes de ciclo corto, así como al 0,53 reportado en la especie apomítica *Limonium dufourii* (Nybom, 2004).

El valor de F_{st} calculado para los 28 individuos *R. glaucus* de los cuatro departamentos unificados como una sola población fue 0,354, similar al encontrado en 12 poblaciones de frambuesa (*R. idaeus*) silvestre colectadas en Escocia de 0,348 con diferencias significativas entre las poblaciones colectadas (Graham *et al.*, 2009b), lo cual indicaría algún tipo de variación entre accesiones *R. glaucus* no asociada con el sitio de origen.

Los valores de F_{st} obtenidos al comparar las especies *Rubus* silvestres y las *R. glaucus* (0,595) y en el caso del grupo unificado de 28 accesiones *R. glaucus* provenientes de los cuatro departamentos (0,354), son superiores al obtenido en la evaluación de las especies de la familia Rosaceae, *Crataegus douglasii* (4x) y *Crataegous suksdorfii* (2x,3x y 4x), las cuales difieren en su nivel de ploidía, y mostraron un valor de F_{st} de 0,176 (Lo *et al.*, 2009). Por su parte, las poblaciones tetraploides de *C. douglasii*, representadas por 147 individuos tuvieron un F_{st} de 0,079 un valor relativamente cercano al observado (0,026) en las 28 accesiones divididas por departamento.

En 19 poblaciones de *R. idaeus* de Lituania evaluadas con marcadores RAPDs, se encontró los resultados del AMOVA mostraron poblaciones con estructura y predominio de reproducción sexual, de acuerdo a la variación observada entre poblaciones de 23%, 74% en individuos dentro de poblaciones, 3% entre subregiones y el estadístico Φ_{ST} igual a 0,258 para *R. idaeus* según Patamsytė *et al.* (2010). Los resultados en la presente colección señalan una tendencia contraria, en la que la diferencia entre poblaciones silvestres y cultivadas (70%) es superior a la variación dentro de éstos dos grupos (30%) y el Φ_{ST} es igual a 0,697. Y al analizar las accesiones *R. glaucus*, se encuentra una variación de 1% no significativa entre departamentos, un F_{st} de 0,026 y un Φ_{ST} igual a 0,014 que indicaría una mayor influencia de la reproducción asexual favorecida por acción el hombre y poblaciones poco estructuradas, debido al flujo de material de multiplicación clonal.

Sin embargo, en el caso de *R. glaucus* la variación entre individuos no estaría asociada a la división por departamentos, ya que cuando se analizan los 28 individuos distribuidos en los cuatro departamentos el F_{st} es 0,026, se observa una reducción sustancial frente al F_{st} sin división por departamentos (0,354). De igual manera se observa en el dendrograma la falta de asociación con la procedencia geográfica de las accesiones, lo cual concuerda con Lo *et al.* (2009), donde señala que la variación genética no siempre se estructura a escala geográfica en especies de reproducción sexual, en especies con varias formas de reproducción se incrementan los factores incidiendo en la estructura de las poblaciones.

La desviación estándar del F_{st} está entre 0,01 y 0,03, lo cual indica que el estadístico F_{st} calculado por estadística bayesiana ofrece una precisión robusta de la estimación interpoblacional. Esto se debe a que cuando se trabaja con marcadores de tipo dominante, la aproximación bayesiana permite hacer una estimación adecuada de las frecuencias alélicas y por ende, de los estadísticos F basados en ellas (Zhivotovsky, 1999), en particular en los casos en que se presentan marcadores con bajo polimorfismo y pocos individuos por población (Krauss, 2000).

Además de la necesidad de determinar la ocurrencia de la apomixis en las especies *Rubus* colombianas, otro factor relevante en los análisis de diversidad es establecer los niveles de ploidía, como observó Lo *et al.* (2009), en dos especies del género *Crataegus* (Rosaceae) evaluadas en Norteamérica. A este género pertenecen las especies *Crataegus douglasii*, la cual es tetraploide, autocompatible y presenta pseudogamia, mientras que *Crataegus suksdorfii* incluye individuos diploides de reproducción sexual y poliploides apomícticos (Lo *et al.*, 2009). La variabilidad genotípica de acuerdo a los marcadores microsatélite, fue superior en los diploides comparados con triploides y tetraploides, lo cual se atribuyó a la reproducción sexual de los individuos diploides (Lo *et al.*, 2009). De acuerdo con la evaluación con microsatélites desarrollada por Marulanda *et al.* (2007), los individuos de las especies *R. glaucus* mostraron entre tres y cinco alelos, mientras que *R. urticifolius* entre dos y tres alelos, lo que sugiere distintos niveles de ploidía al interior de las especies *Rubus* colombianas.

La evaluación de poblaciones de acuerdo al departamento de origen con los estadísticos F_{st} y Φ_{ST} , indican que la variación presente entre individuos *R. glaucus* no está asociada con el sitio de procedencia, por lo que se puede inferir que aún cuando hay una tendencia a la semejanza en los individuos *R. glaucus* por la preferencia de la reproducción clonal, aún persiste algún grado de diferenciación entre ellos que puede estar asociado a la zona agroecológica más que como tal al departamento de colecta.

Para el aprovechamiento de la variación que se presenta debe conocerse de donde proviene, Ellstrand y Rose (1987) señalan algunas fuentes de variación genética en especies clonales como la ocurrencia alterna o eventual de descendientes producto de reproducción sexual, el suceso de mutaciones (somáticas o germinales) y orígenes múltiples, lo cual estaría permitiendo que haya algunas diferencias que pueden explorarse con miras a un programa de mejoramiento para esta especie como por ejemplo la característica de rudimentos de aguijón. De acuerdo con Duarte (2010), en la evaluación de clones de *R. glaucus* de ocho genotipos diferentes no se encontró uniformidad al interior de las accesiones debido a la mezcla de genotipos. Para establecer qué fuente de variación se encuentra en los materiales de *R. glaucus* debe evaluarse la progenie sexual de individuos *R. glaucus* y sus correspondientes parentales; discriminar el aporte paterno y si hay pérdida de bandas maternas como observaron Antonius y Nybom (1995) en algunos descendientes obtenidos por semilla sexual de zarzamoras tetraploides, así como involucrar una mayor representación de individuos por accesión. Como señalan Ellstrand y Rose (1987), las evaluaciones de progenie permiten un acercamiento a los cambios que pueden ocurrir de una generación a otra, pero estos cambios y la permanencia de los nuevos genotipos en las poblaciones están a merced de fuerzas como la selección y la deriva genética.

En las especies *Rubus* colombianas no se ha determinado la configuración jerárquica de genets y ramets ni en poblaciones silvestres, ni cultivadas. Según Ellstrand y Roose (1987) se puede encontrar diversidad genotípica en algunas especies de plantas clonales debido a que sus poblaciones son multiclonales, por tanto se encuentran niveles intermedios de diversidad y uniformidad genéticas que indican una estructura genética compleja donde ni se establece un genotipo dominante, ni se encuentran varios genotipos en frecuencias más o menos similares. Se ha encontrado que en algunas ocasiones las poblaciones se afectan por la alternancia de reproducción sexual y asexual mediada por cambios de temperatura en zonas templadas (Clark *et al.*, 2007; Ellstrand and Roose, 1987), para comprobar éste supuesto se requeriría el estudio de progenies durante varias generaciones.

4.2. Caracterización morfológica

4.2.1. Análisis de componentes principales

El 85% de la variación total representada en los ocho primeros componentes principales, sugiere que las variables asociadas a éstos permiten hacer una correcta discriminación a nivel morfológico de los materiales de la presente colección de *Rubus*, sin embargo con los primeros cuatro componentes se alcanza una representación importante de la variación total de 60%. Teniendo en cuenta que la distinción de variables de acuerdo al tipo de rama no aporta de manera importante a la discriminación de accesiones de *Rubus*, se identificaron siete variables (cinco vegetativas y dos reproductivas) asociadas a los cuatro primeros componentes que representarían las de mayor relevancia para diferenciar accesiones a saber: longitud de peciolo, longitud de peciolulo, longitud de foliolo, número de aguijones por hoja, número de frutos cónicos, longitud de entrenudos y número de piezas de la corola.

Se encontró que las variables con correlaciones más altas con los cuatro primeros componentes principales, los cuales agrupan el 60% de la variación total fueron: longitud del peciolo tanto de rama reproductiva como vegetativa, longitud del peciolulo de rama vegetativa, longitud del foliolo de rama reproductiva, número de aguijones por hoja de rama vegetativa y reproductiva, longitud de entrenudos de rama reproductiva, número de frutos de forma primaria o cónicos y número de piezas de la corola. Por lo tanto, estos descriptores son los que más aportan en la discriminación de las accesiones de la colección en estudio de los materiales de *Rubus* spp de la colección en estudio (Anexo C).

Zamorano *et al.* (2007), reportaron en materiales colectados en los departamentos de Valle, Cauca y Nariño de las especies *R. glaucus*, *R. urticifolius* y *R. robustus*, siete componentes principales agrupando 78% de la variabilidad de 22 variables cuantitativas. Las variables en las que coincidieron el análisis de componentes del reporte de Zamorano *et al.* (2007), y del presente trabajo como las que más aportan a la variabilidad en las evaluaciones de materiales *Rubus* fueron cinco: longitud del peciolo en ramas vegetativas y reproductivas, longitud del peciolulo de ramas vegetativas y longitud de entrenudos de ramas reproductivas. Sin embargo, en el trabajo de Zamorano *et al.* (2007), fue relevante el ancho de foliolo de rama vegetativa, mientras que en esta colección fue más importante la longitud del foliolo de rama vegetativa y además se incluyeron las variables número de aguijones por hoja en rama vegetativa y reproductiva. A nivel reproductivo no coincidieron los trabajos en ninguna variable, ya que el presente análisis incluyó los descriptores número de frutos de forma cónica y número de piezas de la corola, mientras que Zamorano *et al.* (2007), identificaron peso del fruto, longitud del receptáculo y número de drupas como las variables con mayor aporte en la discriminación de especies de *Rubus* a nivel reproductivo. De acuerdo, con el análisis de componentes principales de Marulanda y López (2009), las variables que agrupan mayor variación en materiales de *R. glaucus* de la zona cafetera colombiana son: longitud del foliolo de rama vegetativa, la cual coincide con los resultados del presente trabajo, diámetro del tallo de rama vegetativa y número de ramas vegetativas que no fueron distintivas de la presente colección.

En la caracterización morfológica realizada por Zamorano *et al.* (2007), se descartaron las variables número de piezas de la corola y número de piezas del cáliz debido a que no fueron discriminantes en la colección estudiada, pero en la presente colección si se incluyeron y la primera fue discriminante entre las accesiones de la especie cultivada y las accesiones silvestres.

En el dendrograma obtenido a partir del análisis de componentes principales se observó la conformación de tres grupos, el primero se refiere a las dos especies silvestres, mientras que los materiales de *R. glaucus* se agruparon en los grupos dos y tres. Sin embargo, el grupo dos con individuos de *R. glaucus* es más cercano al grupo uno de materiales silvestres que al grupo tres conformado por otros *R. glaucus*. La mayor afinidad entre estos dos grupos se debe principalmente a la similitud en características de las hojas como una menor longitud en peciolo en rama reproductiva, peciolulo en rama vegetativa y foliolo en rama reproductiva comparado con el grupo tres (Tabla 3-10). Mientras que los descriptores que tienen en común los grupos dos y tres son: mayor longitud de peciolo en rama vegetativa, menor número de aguijones en ambos tipos de rama, mayor número de frutos de forma cónica y entrenudos en rama reproductiva más cortos que las especies silvestres. Por tanto, pareciera que dentro de *R. glaucus* hay algunas accesiones intermedias con mayor cercanía o introgresiones de las accesiones

silvestres y otras que han sido objeto de selección hacia características de interés comercial. Queda claro que hay características que distinguen los materiales silvestres de los cultivados como la disminución en el número de aguijones en hoja, en la longitud de los entrenudos e incremento en el tamaño de órganos fuente como folíolos, peciolo y peciolulo. Zamorano *et al.* (2007), indican que en su colección los descriptores cuantitativos fueron más útiles para identificar caracteres comunes entre materiales que para distinguir entre especies.

El análisis de componentes principales basado en características cuantitativas evidencia variabilidad a nivel fenotípico entre y dentro de los materiales de *Rubus* evaluados. Se observa en el agrupamiento a partir del análisis de componentes principales, que hay una tendencia con algunas excepciones, a encontrar accesiones de *R. glaucus* provenientes del departamento de Caldas en el grupo tres con ocho materiales de quince que lo componen. Por su parte el grupo dos, involucra en mayor proporción materiales de *R. glaucus* originarios del departamento de Antioquia (seis accesiones de catorce). En el trabajo de Zamorano *et al.* (2007), no se reporta ninguna asociación entre el agrupamiento y el lugar de origen de los materiales en cuanto a variables de tipo cuantitativo. Sin embargo, podría considerarse que para la colección en estudio el lugar de origen puede tener alguna influencia por procesos de adaptación a alguna condición ambiental específica o por los criterios de selección a los que haya habido lugar, de manera que se vea reflejado en la respuesta fenotípica de los materiales. Según Ellstrand y Rose (1987) a nivel ecológico las diferencias entre genotipos pueden validar el argumento de que diferentes modos de selección pueden estar involucrados en el mantenimiento de la diversidad clonal a nivel local, independiente del modo de reproducción.

4.2.2. Análisis de coordenadas principales

Zamorano *et al.* (2007), descartaron la característica de color del envés verde por no ser discriminante para su colección con el análisis de componentes principales, pero en la presente evaluación el análisis de coordenadas principales, ésta característica diferenció las especies silvestres *R. urticifolius* y *R. floribundus* de las accesiones de *R. glaucus* que presentaron envés blanco (Tabla 3-11). Mediante el análisis de agrupamiento basado en el índice de similitud de Dice, Zamorano *et al.* (2007) obtuvieron tres agrupaciones claras por cada una de las especies en estudio. De igual manera las tres especies evaluadas en el presente estudio (*R. glaucus*, *R. urticifolius* y *R. floribundus*) se agruparon de manera separada, mostrando mayor cercanía entre sí los individuos de las accesiones *R. urticifolius* y *R. floribundus*.

El análisis de coordenadas principales indica que los descriptores cualitativos, al igual que los marcadores AFLPs y los descriptores cuantitativos son útiles en la discriminación de accesiones de especies de *Rubus*, en diferentes niveles de minuciosidad. Aunque el análisis de las características cualitativas sugiere que las entradas de *R. glaucus* de la colección tienen una alta similitud al igual que en el análisis molecular, se determinan tres agrupaciones dentro de la población *R. glaucus*. La agrupación 3A en la figura 3-5, muestra que la característica hoja subcordada es prevalente en materiales provenientes de los departamentos de Caldas y Antioquia y diferencial con respecto a los grupos 1 y 2. Los grupos 1 y 2 se conforman cada uno de una sola accesión que se diferencian de los demás materiales principalmente por características referentes a los aguijones.

Se debe destacar la accesión RG38, la cual parece ser más domesticada ya que se distingue de las demás accesiones por la presencia de rudimentos de aguijón, es decir que el aguijón que se encuentra en la mayoría de materiales de *R. glaucus* ha sufrido una modificación hacia una estructura menos rígida, de manera que las labores de campo y cosecha se facilitan con este tipo de plantas; mientras el resto de características fenotípicas a nivel cualitativo son comunes con las otras entradas de *R. glaucus*. En cuanto a sus características cuantitativas, RG38 no muestra alguna distinción notable con los materiales *R. glaucus*, se agrupa en el grupo tres del dendrograma del análisis de componentes principales que se destaca por tener órganos vegetativos de mayor tamaño (longitud de foliolos, peciolos y peciolulos) lo cual podría ver reflejado en frutos de más grandes. En ese mismo sentido, Marulanda y López (2009) indican que los genotipos sin aguijones tienen la misma productividad y tamaño de fruto que los materiales con aguijones. La característica “sin espinas” o “thornlessness”, se ha reportado en otras especies de zarzamoras *Rubus* y a nivel comercial ha tenido importancia en el desarrollo de variedades (Clark *et al.*, 2007; Coyner *et al.*, 2005). En Colombia puede tener un impacto importante en la producción de mora ya que al mejorar la eficiencia en las labores de campo se pueden reducir costos de producción. No obstante, la ausencia de aguijones es una característica que ha mostrado tanto herencia dominante como recesiva (Coyner *et al.*, 2005), por tanto es prioritario conocer el tipo de herencia en los materiales de *R. glaucus* para el uso de éstos cultivares como parentales en un programa de mejoramiento.

Tal como lo señala Marulanda *et al.* (2007), sobre la presencia de diferentes números de alelos con marcadores microsatélite en individuos de las especies *R. glaucus* y *R. urticifolius*, entre otras; de donde se infiere una diferencia en ploidía al interior de dichas especies; se asume que tal condición tiene efectos en la reorganización de los genomas y finalmente en el fenotipo de los individuos (Yang *et al.*, 2010). En particular Yang *et al.* (2010), menciona que en aloploidos, como se considera a *R. glaucus*, los cambios como pérdida y/o ganancia de sitios de restricción, aparición de nuevos alelos, etc. parecen ocurrir en etapas tempranas posteriores a la poliploidización, lo que podría

explicar el comportamiento fenotípico diferente en algunos caracteres de algunos materiales *R. glaucus* evaluados en el presente trabajo.

Según Yang *et al.* (2010), dentro de las ventajas evolutivas que confiere la poliploidía está el aumento en “fitness” debido a la fijación de la heterocigosidad y un mayor conjunto de genes y alelos sobre los cuales puede actuar la selección. En aloploidos pueden fijarse las interacciones positivas de genes homeólogos entre los genomas alternos, lo cual tiene un comportamiento similar a la heterosis en organismos diploides (Yang *et al.*, 2010). La interacción de individuos con este tipo de conformación genética con distintos ambientes puede ser causante de fenotipos alternativos de un genotipo dado con adaptación o no a diferentes condiciones, como lo reportan Ellstrand y Rose (1987) en poblaciones clonales.

Para poblaciones naturales de la especie clonal *Rubus hirtus* donde se evaluó diversidad genética con marcadores RAPDs y su variabilidad morfológica, se encontró mayor variabilidad genética de la esperada ya que de 20 individuos, nueve fueron genets. Se encontró una fuerte interacción del ambiente en el desempeño de los materiales, siendo responsables del 24% de las diferencias entre individuos las características intensidad de la luz y la competencia entre plantas (Gazda *et al.*, 2007). Aunque Gazda *et al.* (2007), señalan una alta variabilidad genética en su población, en el presente trabajo el análisis molecular indica para *R. glaucus* una baja diversidad genética, pero en ambos casos pareciera haber una interferencia notoria del componente ambiental en el comportamiento morfológico de los individuos, por lo que Gazda *et al.* (2007), sugieren que en *Rubus* la influencia del componente genético no es tan decisivo en el comportamiento fenotípico de los materiales lo cual podría ayudar a mantener la variabilidad genética en la poblaciones a pesar de su reproducción vegetativa.

Con un comportamiento un poco más similar al observado en *R. glaucus*, la especie *Rubus chamaemorus* en el análisis con marcadores RAPDs e isoenzimas mostró que las poblaciones tenían variación a pesar de su reproducción clonal (Korpelainen *et al.*, 1999). Dentro de las poblaciones, los niveles de diversidad genética estimados con el índice de Simpson fueron bajos, además se observó la presencia de pocos clones identificados vía molecular comparados con los clones observados fenotípicamente, algunos de ellos con una dispersión espacial inusualmente amplia (Korpelainen *et al.*, 1999).

Con base en el análisis molecular se puede sugerir que la población *R. glaucus* de la colección puede estar conformada por pocos genotipos con diferentes grados de dispersión, como se ha observado en varias especies *Rubus* cuya reproducción es

principalmente de carácter apomíctico o vegetativo (Korpelainen *et al.*, 1999; Nybom and Schaal, 1990). De acuerdo con Korpelainen *et al.* (1999), en poblaciones *R. chamaemorus* el contraste entre una baja diversidad genética frente a una amplia variabilidad morfológica es de importancia tanto para la domesticación de la especie como para el trabajo en mejoramiento genético, ya que la labor de selección de genotipos sobresalientes tiene una importante influencia de la interacción con el ambiente.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

Las tres combinaciones de cebadores AFLPs utilizadas presentaron patrones de bandas reproducibles y con suficiente polimorfismo para realizar trabajos de caracterización molecular en accesiones *Rubus*. Los marcadores AFLPs y las características morfológicas permiten hacer distinciones claras entre las cinco especies *Rubus* en estudio, coincidiendo con la determinación taxonómica tradicional.

El análisis de diversidad de 39 accesiones con tres combinaciones de cebadores AFLPs indicó que para la colección de referencia, las especies silvestres contribuyen de manera importante a la diversidad en las accesiones del género *Rubus*. Mientras que para la especie de cultivares tradicionales *R. glaucus*, el análisis molecular indicó una baja diversidad genética, en especial si se asocia con el origen geográfico tanto a nivel inter como intradepartamental.

El análisis de datos cuantitativos y cualitativos mostraron diversidad en toda la colección *Rubus* a nivel morfológico incluso en los materiales *R. glaucus*, contrario a lo observado a nivel molecular. También se identificaron algunas asociaciones entre la respuesta fenotípica y el departamento de origen, de manera que los genotipos *R. glaucus* en particular pueden mostrar variaciones en su respuesta fenotípica según el ambiente en el que han sido objeto de selección.

5.2. Recomendaciones

Evaluar colección *Rubus* y cultivares *R. glaucus* en particular con marcadores de codominantes.

Realizar estudios de biología reproductiva, presencia de apomixis en *R. glaucus*.

Ejecutar estudios de citogenética en el género *Rubus*.

Estudiar poblaciones naturales por conformación organizacional (genets y ramets).

Evaluar progenie sexual de *R. glaucus* y compararla con sus parentales.

Evaluar la distinción entre ramas vegetativas y reproductivas.

Estudiar herencia característica rudimentos de aguijón

Anexo A. Descriptores para la caracterización de la Colección de mora *Rubus* spp. (Córdoba and Londoño, 1996; Zamorano *et al.*, 2007)

Cualitativos

1. Cerosidad del tallo (CET): ausencia o presencia de cerosidad en dos tallos jóvenes vegetativos y dos tallos jóvenes reproductivos.
 - 1.1. Ramas vegetativas (CETV)
 - 0 Ausente
 - 1 Presente
 - 1.2. Ramas reproductivas (CETR)
 - 0 Ausente
 - 1 Presente
2. Pubescencia en el tallo (PUT): ausencia o presencia de tricomas en el tercio medio de la planta.
 - 2.1. Ramas Vegetativas (PUTV)
 - 0 Ausente
 - 1 Presente
 - 2.2. Ramas Reproductivas (PUTR)
 - 0 Ausente
 - 1 Presente
3. Forma del tallo (FT): forma de tallo vegetativo y reproductivo, observado en los tres entrenudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.



1. Redondo



2. Acanalado

4. Forma de aguijones en el tallo (AGT): forma de los aguijones en un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo por planta, observados en los tres entrenudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

- 4.1. Ramas Vegetativas (AGTV)
 - 0 Ausentes
 - 1 Rectos
 - 2 Recurvados
 - 3 Rudimento de aguijón
 - 4 Rectos y recurvados
- 4.2. Ramas Reproductivas (AGTR)
 - 0 Ausentes
 - 1 Rectos
 - 2 Recurvados
 - 3 Rudimento de aguijón
 - 4 Rectos y recurvados
- 5. Base del aguijón en el tallo (BAGT): base de los aguijones en un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo por planta, observados en los tres entrenudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
 - 5.1. Ramas Vegetativas (BAGTV)
 - 1 Amplia
 - 2 Angosta
 - 5.2. Ramas Reproductivas (BAGTR)
 - 1 Amplia
 - 2 Angosta
- 6. Forma de aguijones en la hoja (AGH): forma de los aguijones observada en tres hojas (sobre la nervadura central y el peciolulo del foliolo terminal) de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
 - 6.1. Ramas Vegetativas (AGHV)
 - 0 Ausentes
 - 1 Rectos
 - 2 Recurvados
 - 3 Rudimento de aguijón
 - 4 Rectos y recurvados
 - 6.2. Ramas Reproductivas (AGHR)
 - 0 Ausentes
 - 1 Rectos
 - 2 Recurvados
 - 3 Rudimento de aguijón
 - 4 Rectos y recurvados
- 7. Base del aguijón en la hoja (BAGH): forma de la base de los aguijones observada en tres hojas (sobre la nervadura central y el peciolulo del foliolo terminal) de un tallo

vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

7.1. Ramas Vegetativas (BAGHV)

1 Amplia

2 Angosta

7.2. Ramas Reproductivas (BAGHR)

1 Amplia

2 Angosta

8. Forma de la hoja (FHOJ): forma de la hoja observada en tres folíolos terminales de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

8.1. Ramas Vegetativas (FHOJV)

8.2. Ramas Reproductivas (FHOJR)



1. Trifoliolada



2. Palmeada



3. Trifoliada y Palmeada

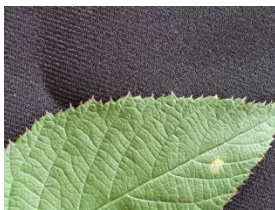


4. Imparipinnada

9. Margen de la hoja (MARH): forma del margen del limbo, observada en tres folíolos terminales de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

9.1. Ramas Vegetativas (MARHV)

9.2. Ramas Reproductivas (MARHR)



1. Serrado



2. Biserrado



3. Serrulado

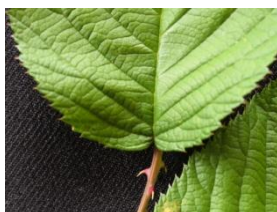
10. Base de la hoja (BASH): forma de la base del folíolo, observada en tres folíolos terminales de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

10.1. Ramas vegetativas (BASHV)

10.2. Ramas reproductivas (BASHR)



1. Obtusa



2. Subcordada



3. Subtruncada

4. Subcordada y subtruncada

11. Ápice de la hoja (APHOJ): forma del ápice del folíolo, observada en tres folíolos terminales de un tallo vegetativo y un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

11.1. Ramas vegetativas (APHOJV)

11.2. Ramas reproductivas (APHOJR)



1. Acuminado



2. Agudo



3. Redondeado

12. Forma del folíolo (FFOL): forma observada en tres folíolos terminales de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.

12.1. Ramas vegetativas (FHOJV)

12.2. Ramas reproductivas (FHOJR)



1. Ovada



2. Ovado-elíptico



3. Ovado-rómbico

13. Color del envés (CENV): color del envés observado en tres hojas de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo, tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja completamente desarrollada desde el ápice.

13.1. Ramas vegetativas (CENVV)

13.2. Ramas reproductivas (CENVR)

1. Verde

2. Blanco

3. Otro

14. Color de la corola bb: color de los pétalos en cinco flores por planta.

1. Blanco

2. Lila

3. Otro

15. Forma del pétalo (FPET): forma de un pétalo por flor en una muestra de cinco flores por planta.



16. Color del cáliz me: color de los sépalos en cinco flores por planta.

1. Verde

2. Otro

Cuantitativos

1. Diámetro del tallo (DIAMT): diámetro del tallo en el tercio medio de la planta de 3 ramas vegetativas y 3 reproductivas por planta.

2. Longitud de entrenudos (LENT): longitud (desde la base de la hoja a la base de la siguiente hoja) de los tres entrenudos posteriores a la quinta hoja desde el ápice, en un tallo vegetativo y un tallo reproductivo, por planta.

3. Número de aguijones en el tallo (NAGT): número de aguijones en cada uno de los tres entrenudos posteriores a la quinta hoja contando desde el ápice, en un tallo vegetativo y un tallo reproductivo por planta.

4. Número de aguijones en la hoja (NAGH): número de aguijones presentes sobre el peciolulo y la nervadura central de tres folíolos terminales, de un tallo vegetativo y de un tallo reproductivo por planta. Tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
5. Tamaño de estípulas (TAMEST): longitud de tres estípulas en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo por planta, Tomando las estípulas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
6. Longitud del foliolo (LFOL): longitud del limbo de tres folíolos terminales, en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo por planta, Tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
7. Ancho del foliolo (ANFOL): ancho de tres folíolos terminales, tomado en la parte más amplia del limbo, en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo por planta. Tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
8. Longitud del peciolo (LPEC): longitud de tres peciolo, en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo por planta. Tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja desde el ápice.
9. Longitud del peciolulo (LPLULO): longitud de tres peciolulos, en un tallo vegetativo y en un tallo reproductivo por planta. Tomando las hojas en los tres nudos siguientes a la quinta hoja completamente desarrollada desde el ápice.
10. Número de piezas de la corola (NPCOR): número de pétalos de la corola en cinco flores por planta.
11. Número de piezas del cáliz (NPCA): número de sépalos del cáliz en cinco flores por planta,
12. Longitud del pétalo (LPET): longitud de un pétalo por flor en milímetros, tomando cinco flores por planta.
13. Ancho del pétalo (APET): ancho de un pétalo por flor en milímetros, tomando cinco flores por planta.
14. N° de frutos de forma primaria (NFP): número de frutos cónicos en 20 frutos.
15. N° de frutos de forma secundaria (NFS): número de frutos redondeados en 20 frutos.
16. Peso del fruto (PFRUT): peso promedio de 20 frutos por planta.
17. Diámetro del fruto (DFRUT): diámetro de 20 frutos por planta.
18. Longitud del fruto (LFRUT): longitud de 20 frutos por planta.

- 19. Diámetro del receptáculo (DREC): diámetro del receptáculo de cinco frutos por planta.
- 20. Longitud del receptáculo (LREC): longitud del receptáculo de cinco frutos por planta.
- 21. Número de drupeolas (NDRUP): número de drupeolas de cinco frutos por planta.
- 22. Rendimiento (REND): rasgo a tomar con base en el peso en gramos de frutos por planta.

Anexo B. Cuantificación de ADN de 39 accesiones de la colección de germoplasma *ex situ* de *Rubus* spp

Accesión	Relación 260/280	Concentración (ng/μl)
RG01	1,86	83,4
RG02	1,90	48,7
RG03	1,80	35,7
RG04	1,80	42,1
RG05	1,85	38,8
RG06	1,86	55,1
RG07	1,95	63,4
RG08	1,71	42,6
RG09	1,77	55,2
RG10	1,89	76,3
RG11	1,91	93,5
RG12	1,88	101,7
RG13	1,90	96,0
RG14	1,94	126,2
RG15	1,90	118,7
RG16	1,91	139,8
RG17	1,95	147,0
RG18	1,94	111,9
RG19	1,90	137,1
RG20	1,86	115,0
RG21	1,89	108,6
RG22	1,82	64,1
RG23	1,83	74,6
RG24	1,85	68,0
RG25	1,81	115,4
RG26	1,83	51,8
RG27	1,83	107,8
RG28	1,86	127,0
RG31	1,92	104,8
RG32	1,80	72,9
RG33	1,92	108,3
RG37	1,79	81,7
RG38	1,84	101,0
RG39	1,86	115,2
RF34	1,83	87,0
RF36	1,80	78,6
RNU29	1,83	144,4
RS30	1,83	111,8
RU35	1,84	102,1

Anexo C. Correlaciones entre los descriptores y los cuatro primeros componentes principales

Descriptor	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
DIAMTR	0,17	-0,28	-0,62	-0,18
DIAMTV	0,27	-0,40	-0,24	0,22
NAGTR	-0,67	0,16	-0,38	0,00
NAGTV	-0,58	-0,10	-0,49	-0,29
LENR	0,12	0,46	-0,45	0,57*
LENV	-0,18	0,46	-0,58	0,45
TAMESTR	0,73*	0,41	0,11	-0,19
TAMESTV	0,66	0,55	0,15	0,23
LFOLR	0,81*	0,28	0,14	-0,20
LFOLV	0,74*	0,44	0,15	0,26
ANFOLR	0,65	0,36	0,09	-0,41
ANFOLV	0,69	0,48	0,15	0,13
LPECR	0,92*	-0,02	-0,08	-0,05
LPECV	0,90*	-0,01	-0,08	0,21
LPLULOR	0,77*	0,40	0,09	-0,18
LPLULOV	0,82*	0,36	0,07	0,14
NAGHR	0,01	0,86*	-0,19	-0,25
NAGHV	-0,06	0,85*	-0,21	0,01
NPCOR	-0,09	0,05	0,23	0,16
NPCA	-0,47	0,52	0,22	0,25
LPET	0,05	-0,22	0,50	-0,16
APET	-0,43	0,37	0,14	-0,40
NFP	0,07	0,24	-0,76*	-0,28
NFS	0,24	0,41	-0,51	-0,39
PFRUT	0,63	-0,59	-0,06	0,04
DFRUT	0,61	-0,71	-0,04	-0,04
LFRUT	0,71	-0,53	-0,22	0,06
DREC	0,35	0,00	-0,30	0,08
LREC	0,66	-0,50	-0,30	0,09
NDRUP	0,57	-0,50	-0,30	-0,08
REND	0,45	0,03	0,12	-0,40

*Descriptores con las correlaciones más altas

BIBLIOGRAFÍA

- Agronet, 2008 Producción nacional agropecuaria por producto (mora). *In*: M. d. A. y. D. Rural (ed.), vol. 2009, Bogotá.
- Alice, L.A., 2002 Evolutionary relationships in *Rubus* (Rosaceae) based on molecular data. *Acta Horticulturae* (ISHS). **585**: 79-83.
- Alice, L.A., C.S. Campbell, 1999 Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Am. J. Bot.* **86**: 81-97.
- Amsellem, L., J.-L. Noyer, M. Hossaert-McKey, 2001 Evidence for a switch in the reproductive biology of *Rubus alceifolius* (Rosaceae) towards apomixis, between its native range and its area of introduction. *Am. J. Bot.* **88**: 2243-2251.
- Amsellem, L., J.L. Noyer, T. Le Bourgeois, M. Hossaert-McKey, 2000 Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*. **9**: 443-455.
- Antonius-Klemola, K., 1999 Molecular markers in *Rubus* (Rosaceae) research and breeding. *Journal of horticultural science and biotechnology*. **74**: 149-160.

- Antonius, K., H. Nybom, 1995 Discrimination between sexual recombination and apomixes automixis in a *Rubus* plant breeding programme. *Hereditas*. **123**: 205-213.
- Anttonen, M.J., R.O. Karjalainen, 2005 Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*. **18**: 759-769.
- Ballington, J.R., J.L. Luteyn, M.M. Thompson, K. Romoleroux, R. Castillo, 1993 *Rubus* and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter*. **93**: 9-15.
- BIOVERSITY, CIAT, CIRAD, 2006 New world fruits database. IPGRI International Plant Genetic Resources Institute.
- Castillo, N., 2006 Fingerprinting and genetic stability of *Rubus* using molecular markers- Oregon State University.
- CCI, 1999 Perfil de Producto: Mora Sistema de Inteligencia de Mercados, Corporación Colombia Internacional ed, vol. 4,
http://www.cci.org.co/cci/cci_x/Sim/Perfil%20de%20Productos/perfilmora4.html.
- Clark, J.R., E.T. Stafne, H.K. Hall, C.E. Finn, 2007 Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*. **29**: 17-146.
- Córdoba, O., J. Londoño, 1996 Evaluación de seis materiales de mora (*Rubus* spp) bajo condiciones de clima frío moderado-Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Coyner, M.A., R. Skirvin, M.A. Norton, A.G. Otterbacher, 2005 Thornlessness in Blackberries: A review. *Small Fruits Review*. **4**: 83-106.
- Darrow, G.M., 1952 *Rubus glaucus*, the andes blackberry of Central America and Northern South America. *Ceiba*. **3**: 97-101.

Decisia, 2003 SPAD Data mining and text mining, Paris.

Duarte, D.L., 2010 Evaluación de la huella genómica de genotipos élite de *Rubus glaucus* Benth. con marcadores AFLPs-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Ellstrand, N.C., M.L. Roose, 1987 Patterns of Genotypic Diversity in Clonal Plant Species. *American Journal of Botany*. **74**: 123-131.

Ercisli, S., I. Badjakov, V. Kondakova, A. Atanassov, E. Todorovska, 2008 AFLP-based genetic relationships in wild and cultivated red raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. **22**: 907-910.

Eriksson, O., 1993 Dynamics of genets in clonal plants. *Trends in Ecology & Evolution*. **8**: 313-316.

Eriksson, O., B. Bremer, 1993 Genet dynamics of the clonal plant *Rubus saxatilis*. *Journal of ecology*. **81**: 533-542.

Espinosa, N., C. Medina, M. Lobo, 2009 Identificación taxonómica de las especies de género *Rubus* presentes en la colección colombiana de mora. *In*: L. S. Barrero (ed.) *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*. Corpoica, Bogotá. pp. 25-33.

Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro, 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. **131**: 479-491.

Felsenstein, J., 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-191.

- Ferreira, M.E., D. Grattapaglia, 1998 Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético, vol. Documento 20. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, pp. 220.
- Finn, C., 2008 *Rubus* spp., blackberry. *In*: J. Janick and R. E. Paull (eds.) The Encyclopedia of Fruits and Nuts. CABI, Cambridge, MA. pp. 348-351.
- Franco, G., M. Giraldo, 2001 El cultivo de la mora. Corpoica, Manizales, pp. 86.
- Franco, T., R. Hidalgo, 2003 Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos, vol. 8, Cali, pp. 89.
- Garzón, G.A., K.M. RIEDL, S.J. SCHWARTZ, 2009 Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth). Journal of food Science. **74**: C227-C232.
- Gazda, A., J. Szwagrzyk, H. Nybom, G. Werlemark, 2007 Morphological and genetical variability of *Rubus hirtus* (Waldst. & Kitt.) plants under partly open forest canopy. Polish journal of ecology. **55**: 49-55.
- Ge, X.-J., X.-L. Zhou, Z.-C. Li, T.-W. Hsu, B. Schaal, T.-Y. Chiang, 2005 Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting. Journal of Plant Research. **118**: 415-422.
- Gower, J.C., 1971 A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties. Biometrics. **27**: 857-871.

- Graham, J., C. Hackett, K. Smith, M. Woodhead, I. Hein, S. McCallum, 2009a Mapping QTLs for developmental traits in raspberry from bud break to ripe fruit. TAG Theoretical and Applied Genetics. **118**: 1143-1155.
- Graham, J., B. Marshall, R. Squire, 2003 Genetic differentiation over a spatial environmental gradient in wild *Rubus idaeus* populations. New Phytologist. **157**: 667-675.
- Graham, J., R.J. McNicol, 1995 An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. Theor Appl Genet. **90**: 1128-1132.
- Graham, J., K. Smith, K. MacKenzie, L.J. ., C. Hackett, W. Powell, 2004 The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. Theor Appl Genet. **109**: 740–749.
- Graham, J., M. Woodhead, 2009 Raspberries and Blackberries: The Genomics of *Rubus* Genetics and Genomics of Rosaceae. pp. 507-524.
- Graham, J., M. Woodhead, K. Smith, J. Russell, B. Marshall, G. Ramsay, G. Squire, 2009b New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. **134**: 109-119.
- Hernández, J., T. Walschburger, R. Ortiz, A. Hurtado, 1992 Origen y Distribución de la Biota Suramericana y Colombiana. In: G. Halffter (ed.) La diversidad biológica de Iberoamérica. Acta Zoológica Mexicana, Mexico. pp. 3-24.
- Holsinger, K.E., P.O. Lewis, 2003 Hickory: A package for analysis of population genetic data, 1.1 ed. Department of Ecology & Evolutionary Biology. University of Connecticut.

- Jennings, D.L., E. Carmichael, 1980 Anthocyanin variation in the genus *Rubus*. New Phytologist. **84**: 505-513.
- Kollmann, J., T. Steinger, B.A. Roy, 2000 Evidence of sexuality in european *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. American Journal of Botany. **87**: 1592-1598.
- Korpelainen, H., K. Antonius-Klemola, G. Werlemark, 1999 Clonal structure of *Rubus chamaemorus* populations: comparison of different molecular methods. Plant Ecology. **143**: 123-128.
- Kosman, E., J. Leonard, 2005 Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. Molecular Ecology. **14**: 415-424.
- Kothera, L., C. Richards, S. Carney, 2007 Genetic diversity and structure in the rare Colorado endemic plant *Physaria bellii* Mulligan (Brassicaceae). Conservation Genetics. **8**: 1043-1050.
- Kovach, W.L., 1999 MVSP: Multivariate Statistical Package for Windows, 3.13 ed. Kovach Computing Services, Wales.
- Krauss, S., 2000 Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Molecular Ecology. **9**: 1241-1245.
- Lewers, K., C. Saski, B. Cuthbertson, D. Henry, M. Staton, D. Main, A. Dhanaraj, L. Rowland, J. Tomkins, 2008 A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. BMC Plant Biology. **8**: 69.

- Lindqvist-Kreuze, H., H. Koponen, J.P.T. Valkonen, 2003 Genetic diversity of arctic bramble (*Rubus arcticus* L. subsp. *arcticus*) as measured by amplified fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Botany*. **81**: 805-813.
- Lo, E.Y.Y., S. Stefanović, T.A. Dickinson, 2009 Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; *Rosaceae*) in the Pacific Northwest. *Molecular Ecology*. **18**: 1145-1160.
- Lopes, M.S., G.B. Maciel, D. Mendonça, F.S. Gil, A.D.C. Machado, 2006 Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *Rubus hochstetterorum* and their use in other species from the *Rosaceae* family. *Molecular Ecology Notes*. **6**: 750-752.
- Marulanda, M., A. Lopez, 2009 Characterization of thornless *Rubus glaucus* in Colombia. *Canadian Journal of pure & applied sciences*. **3**: 875-885.
- Marulanda, M., A.M. Lopez, S. Aguilar, 2007 Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and applied Biotechnology*. **7**: 242-252.
- Marulanda, M., M.d.P. Marquez, 2001 Caracterización de la diversidad de *Rubus glaucus* Benth con marcadores moleculares RAPD. *Actualidades biológicas*. **23**: 57-63.
- May, R., 1975 Patterns of species abundance and diversity. *In*: C. Martin and J. Diamond (eds.) *Ecology and evolution of communities*. Harvard University Press.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman, M.H. Ebert, 1981 Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. **211**: 1437-1438.

- Michalakis, Y., L. Excoffier, 1996 A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. **142**: 1061-1064.
- Monasterio-Huelin, H., 1995 Biología de reproducción en *Rubus* L. (*Rosaceae*). Propagación Vegetativa. *Anales Jardín Botánico de Madrid*. **52**: 145-149.
- Morillo, A.C., Y. Morillo, J.E. Muñoz, H.D. Vásquez, A. Zamorano, 2005 Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Acta Agronómica*. **54**: 1-15.
- Nei, M., 1987 Genetic variation within species *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. pp. 176-207.
- Nei, M., W.H. Li, 1979 Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proceedings of the National Academy of Sciences on the United States of America*. **76**: 5269-5273.
- Nybom, H., 2004 Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraespecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. **13**: 1143-1155.
- Nybom, H., T. Kraft, 1995 Application of DNA fingerprinting to the taxonomy of European blackberry species. *Electrophoresis*. **16**: 1731-1735.
- Nybom, H., S.H. Rogstad, B.A. Schaal, 1990 Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (*Rosaceae*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*. **79**: 153-156.

- Nybom, H., B.A. Schaal, 1990 DNA "fingerprints" reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *American Journal of Botany*. **77**: 883-888.
- Pamfil, D., R.H. Zimmerman, S.K. Naess, H.J. Swartz, 2000 Investigation of *Rubus* breeding anomalies and taxonomy using RAPD analysis. *Small Fruits Review*. **1**: 43-53.
- Patamsytė, J., V. Kleizaitė, T. Čėsniėnė, V. Rėnėelis, D. Źvingilė, 2010 The genetic structure of red raspberry (<i>Rubus idaeus</i> L.) populations in Lithuania. *Central European Journal of Biology*. **5**: 496-506.
- Patel, A.V., J. Rojas-Vera, C.G. Dacke, 2004 Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*. **11**: 1501-1512.
- Patiño, V.M., 2000 Historia y dispersi3n de los frutales nativos del neotr3pico, vol. 326, Cali, pp. 665.
- Peakal, R., P.E. Smouse, 2006 GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research Molecular Ecology Notes. The Australian National University.
- Pla, L., 2006 Biodiversidad: Inferencia basada en el 3ndice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*. **31**: 583-590.
- Popenoe, H., S. King, J. Le3n, L. Kalinowski, N. Vietmeyer, M. Dafforn, 1989 Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. *In*: N. R. C. Staff (ed.). National Academies Press, Washington. pp. 409.

Popenoe, W., 1920 The colombian berry or giant blackberry of Colombia. J Hered. **11**: 195-202.

Popenoe, W., 1921 The Andes berry. J Hered. **12**: 387-393.

Rivera, D., E. Linares, M.S. Carrizosa, C. Ramírez, 1997 Conservación de germoplasma de moras silvestres (*Rubus* spp.) de la cuenca del río el Palmar, municipio de Ubaque (Cundinamarca, Colombia). I: Distribución y ecología. Plant Genetic Resources Newsletter. **111**: 40-52.

Rodríguez, J., 2002 Aspectos socioeconómicos de los sistemas de producción de mora y lulo en Colombia IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Corpoica, Medellin.

Rohlf, F.J., 1993 NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, 2.0 ed. Exeter Software, Setauket, NY.

Rohlf, F.J., R.R. Sokal, 1981 Comparing numerical taxonomic studies. Systematic Zoology. **30**: 459-490.

Romoleroux, K., 1996 Rosaceae. In: G. Harling and L. Annderson (eds.) Flora del Ecuador, vol. 56. University of Goteborg, Lund. pp. 169p.

Santana, G., M. Echeverri, 2000 Estudio preliminar de biología floral en mora de castilla *Rubus glaucus* Bent Tercer seminario de frutales de clima frío moderado, Manizales. pp. 46-50.

Shannon, C.E., W. Weaver, 1949 The mathematical theory of communication. In: U. o. I. Press (ed.). Urbana, IL, United States. pp. 144.

- Sneath, P.H.A., R.R. Sokal, 1973 Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, pp. 573.
- Stace, C.A., 1991 Plant Taxonomy and Biosystematics, 2 ed, pp. 272.
- Stafne, E.T., J.R. Clark, 2004 Genetic relatedness among eastern North American blackberry cultivars based on pedigree analysis. *Euphytica*. **139**: 95-104.
- Stafne, E.T., J.R. Clark, A.L. Szalanski, 2003 Nuclear ribosomal ITS region sequences for differentiation of *Rubus* genotypes. *Journal of the Arkansas Academy of Science*. **57**: 176-180.
- Strik, B.C., J.R. Clark, C.E. Finn, M.P. Bañados, 2007 Worldwide Blackberry Production. *HortTechnology*. **17**: 205-213.
- Thompson, M., 1997 Survey of Chromosome Numbers in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae) *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **84**: 128-164.
- Vos, P., R. Hogers, M. Zabeau, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Ward, J., 1963 Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*. **58**: 236-244.
- Weber, H.E., 1996 Former and modern taxonomy treatment of the apomictic *rubus* complex. *Folia Geobot Phytotax.* **31**: 373-380.
- Weir, B.S., C.C. Cockerham, 1984 Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. **38**: 1358-1370.

Yang, X., C.-Y. Ye, Z.-M. Cheng, T. Tschaplinski, S. Wulschleger, W. Yin, X. Xia, G. Tuskan, 2010 Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 1-11.

Yap, I., R. Nelson, 1996 Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. International Rice Research Institute IRRI, Manila.

Yeh, F., R.-c. Yang, T. Boyle, 1999 Popgene: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, 32 ed. University of Alberta

Centre of International Forestry Research.

Zamorano, A., A.C. Morillo, Y. Morillo, H. Vásquez, J. Muñoz, 2007 Caracterización morfológica de mora en los departamentos de Valle del Cauca, Cauca y Nariño, de Colombia. *Acta Agronómica*. **56**: 51-60.

Zhivotovsky, L., 1999 Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*. **8**: 907-913.